



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

Determinación de Prevalencia de Anticuerpos contra la malaria con el antígeno AMA-1 en los pobladores de localidades de Bellavista (Sullana – Perú), 2010.

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor:

Nancy Katherin Suárez Guevara

Asesor:

Mg. Ramsés Salas Asencios

Jurados:

Mg. Santa Cruz Carpio, Carlos Marco

Mg. Maldonado Peña, María Luz

MSc. Bohórquez Meza, Isabel

Lima – Perú

2019

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio del Grupo Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por brindarme la disponibilidad de sus instalaciones para desarrollar el presente trabajo.

A la PhD. Dionicia Gamboa Vilela, coordinadora del laboratorio, y al MSc. Juan José Contreras Mancilla por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y brindarme asesoría a lo largo del presente trabajo.

Igualmente, al MSc. Ramses Salas por su asesoría, comentarios y correcciones con respecto a la elaboración, ejecución y redacción de la presente tesis.

Una especial mención a mis padres y hermanos que fueron un soporte y apoyo incondicional durante toda la carrera al igual que mis amigas Katherine Tello Chauca y Claudia Sánchez Antezana por animarme siempre a concluir con todos los proyectos iniciados.

ÍNDICE

RESUME.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Descripción y formulación del problema.....	9
1.2 Antecedentes.....	10
1.3 Objetivos.....	11
1.4 Justificación.....	12
1.5 Hipótesis.....	12
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Generalidades.....	13
2.1.1 Malaria en el Mundo.....	13
2.1.2 Malaria en el Perú.....	13
2.1.3 Ciclo Biológico.....	14
2.1.4 Diagnostico de la enfermedad	
2.1.4.1 Diagnóstico Clínico.....	16
2.1.4.2 Diagnóstico de Laboratorio.....	17
2.1.5 Fuente de Antígeno.....	18
2.1.6 Obtención de los Anticuerpos.....	19
2.1.7 Medición de los Anticuerpos.....	21
2.1.8 Vida media de los Anticuerpos de Malaria.....	24
2.1.9 Determinación del punto de corte.....	26
2.1.10 Factores Socio – Epidemiológicos.....	28
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1 Materiales de Laboratorio.....	31
3.2 Material Biológico.....	31
3.3 Ensayo de ELISA.....	32
3.4 Proceso de recolección de datos.....	33
3.5 Plan de Análisis de datos	
3.5.1 Análisis de Seropositividad.....	34
3.5.2 Operacionalización de Variables.....	35
3.6 Descripción de Variables.....	36
3.7 Análisis de datos.....	37
3.8 Consideraciones éticas.....	38

4. RESULTADOS	
4.1 Características de la Población de Estudio.....	39
4.2 Prevalencias de Anticuerpos contra el parasito.....	41
4.3 Factores de riesgo asociados a la exposición al parasito	
4.3.1 Factores asociados a <i>P. vivax</i>.....	41
4.3.2 Factores asociados a <i>P. falciparum</i>.....	44
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIONES.....	49
7. RECOMENDACIONES.....	49
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	50
9. ANEXOS	
9.1 Encuesta epidemiológica.....	54
9.2 Interface de la plantilla utilizada para establecer el	
porcentaje de positividad.....	61
9.3 Modelo mixto desarrollado por Ángel Rosas.....	63

RESUMEN

Actualmente, la incidencia de malaria en el mundo se está reduciendo. En esta coyuntura, es importante establecer medios sensibles e informativos para censar la presencia del parásito en zonas de baja transmisión. Calcular la prevalencia de anticuerpos específicos a *Plasmodium* spp. permite medir la exposición de la población y determinar los factores de riesgo asociados a la exposición al agente etiológico. Por ello se hizo un censo en 2 localidades de la costa norte peruana, las cuales se encuentran cerca de un Dren de agua, incluyendo la distancia de los hogares al dren se reunió información socio-económica y se tomó muestras de sangre en papel filtro para calcular la prevalencia de anticuerpos específicos a *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Las muestras se analizaron por ELISA indirecto contra un antígeno específico de *P. vivax* (PvAMA-1) y *P. falciparum* (PfAMA-1). Con el uso de un modelo mixto, se determinó que la prevalencia de anticuerpos específicos contra *P. vivax* y *P. falciparum* fue 15.78% y 8.51%, respectivamente. Además, se identificó que tener más de 10 años, vivir en la localidad de José Carlos Mariategui y que la vivienda se encuentre cerca al dren son factores de riesgo asociados a la exposición a *P. vivax*. Por otro lado, los pobladores entre 11 y 40 años tienen mayor riesgo a estar expuestos a *P. falciparum*. Además, la transmisión por *P. vivax* ha aumentado en los últimos 10 años mientras que *P. falciparum*, se ha reducido en los últimos 5 años.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, ELISA, exposición.

ABSTRACT

Nowadays, malaria's incidence is diminishing worldwide. In this context, it is important to establish sensitive and informative methods that will address the presence of the parasite in low endemic areas. Measuring specific antibodies makes it possible to defy the presence of an infectious agent in a certain area and to identify exposure risk factors. For this reason, a census was made in 2 localities on the Peruvian north coast, which are located near a water dren, including the distance of the homes to the dren, socio-economic information was collected and blood samples were taken on filter paper to calculate the prevalence of specific antibodies to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Samples were analyzed by indirect ELISA against a specific antigen of *P. vivax* (PvAMA-1) and *P. falciparum* (PfAMA-1). With the use of a mixed model, it was determined that the prevalence of specific antibodies against *P. vivax* and *P. falciparum* is 15.78% and 8.51%, respectively. In addition, it was identified that having more than 10 years, living in the José Carlos Mariategui locality and living closer to the dren are risk factors associated with exposure to *P. vivax*. On the other hand, residents between 11 and 40 years old are at greater risk of being exposed to *P. falciparum*. In addition, *P. vivax* transmission has increased in the last 10 years while *P. falciparum* has been reduced in the last 5 years.

Key words: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, ELISA, exposure.

1. INTRODUCCIÓN

Malaria es una enfermedad causada por 5 especies de parásitos que pertenecen a la familia Apicomplexa, específicamente al género Plasmodium: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. De estos, *P. falciparum* y *P. vivax* son los más dominantes (White, 2014). Los casos causados por *P. falciparum* son los más mortíferos y predominan en África. *P. vivax*, en cambio, está más distribuido a nivel mundial, por ser capaz de desarrollarse en mosquitos de menor temperatura y que sobreviven a mayor altura. Además, tiene un estadio inactivo (hipnozoito) que se mantiene en el hígado de la persona infectada y le permite sobrevivir durante periodos largos donde el mosquito está ausente; frecuentemente durante el invierno (World Health Organization, 2013).

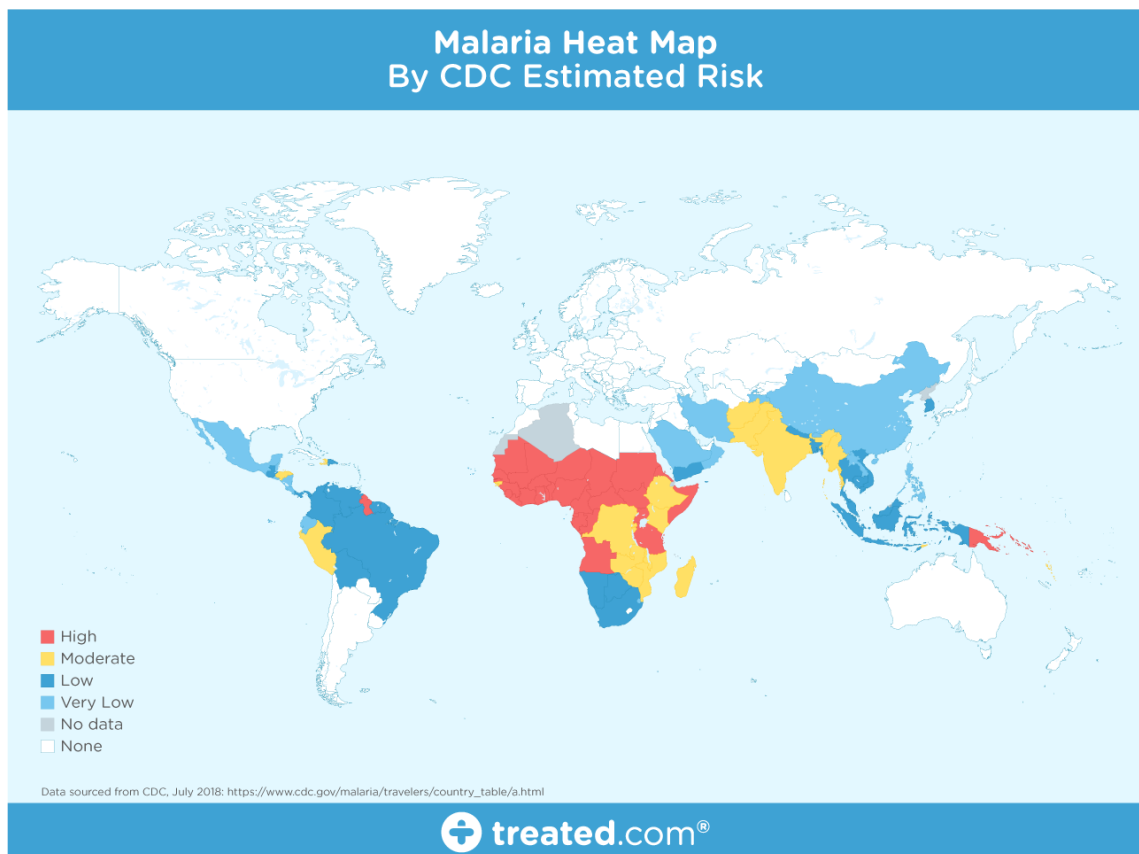
Los principales determinantes de la transmisión de la malaria son la densidad, longevidad, hábitos de picadura y eficiencia del mosquito vector (Sadanand, 2010). En la mayoría de Asia, América Central y América del Sur, donde la transmisión es principalmente baja y estacional, las personas suelen recibir una picadura por año (tasa de inoculación entomológica). La intensidad de transmisión son más altas en África subsahariana, donde *P. falciparum* predomina, y partes de Oceanía donde la tasa de inoculación entomológica pueden ser de hasta 1.000 por año en algunas zonas (Buffet, 2011) (Kodrashin, 2014).

En tales contextos, la morbilidad y la mortalidad por malaria se pronuncian durante la primera infancia, pero en la edad adulta la mayoría de las infecciones de malaria son asintomáticas (Graves, 2009) (Alemu, 2013).

En las zonas donde la transmisión es baja, irregular o focal, la inmunidad protectora completa no se adquiere, y la enfermedad sintomática puede ocurrir en todas las edades (Hafalla, 2011). En estas zonas, los cambios en el medio ambiente, condiciones, por ejemplo, económicas, o sociales, fuertes lluvias después de sequías, grandes movimientos de población, junto con una avería en el control de la malaria y los servicios de prevención puede dar lugar a epidemias, con mortalidad sustancial en todos los grupos de edad (Amaran, 2014).

A esta problemática se le suman factores como la resistencia del *Plasmodium* spp a los antimaláricos, la resistencia de *Anopheles* a los insecticidas, la falta de una vacuna eficaz, el cambio climático mundial y la expansión mundial de las áreas geográficas con condiciones propicias para la transmisión del agente infeccioso, todo lo cual contribuye a empeorar su panorama epidemiológico (Graves, 2009) (Cotter, 2013) (Sturrock, 2013). Lo cual nos obliga a hallar métodos fiables y prácticos que nos ayuden al control y prevención del resurgimiento de la malaria en zonas endémicas de baja transmisión como la costa norte de Perú, metodologías como la serología.

Imagen 1. Distribución de la malaria en el mundo.



Fuente: CDC https://www.cdc.gov/malaria/travelers/country_table/a.html

1.1 DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Hay escasa información que nos permita aproximar y profundizar en la dinámica epidemiológica de exposición a malaria en la zona de estudio. El desarrollo y aplicación de biomarcadores serológicos para medir la exposición a la malaria, son técnicas que fortalecen el control y eliminación de la malaria. Conocer la dinámica de exposición puede ser usado para identificar focos de alta transmisión para decidir dónde implementar intervenciones de control y posteriormente para monitorear cambios en el tiempo producidos por las mismas intervenciones, sobre todo en lugares con baja transmisión de la enfermedad. Además, podría ser usado como herramienta complementaria para verificar si aún existe transmisión en lugares que han alcanzado la eliminación de la enfermedad y/o en lugares donde se sospecha que ha habido un resurgimiento de la malaria (Elliot SR, 2014). El antígeno AMA-1 es un marcador muy sensible debido a su alta inmunogenicidad (Roestenberg M, 2008).

La costa norte, que incluye los departamentos de Piura y Tumbes, han sido históricamente la segunda región más importante para la transmisión de la malaria después de la selva amazónica (Ministerio de Salud Perú, 2014).

Entre 2004 y 2010, la incidencia de malaria por *P. vivax* fluctuó entre 315 y 4.185 episodios al año y la malaria por *P. falciparum* se ha vuelto escasa sin casos autóctonos registrados en 2007, 2009 ni 2010 (Rosas-Aguirre A, 2013). Muchas localidades en Piura no han informado de la malaria durante los últimos cinco años, y los que aún reportan casos están ubicados principalmente en algunos distritos de la provincia de Sullana.

Por tanto, el presente proyecto se plantea la siguiente pregunta:

¿Se puede determinar la Prevalencia de Anticuerpos contra la malaria en los pobladores de localidades de Bellavista (Sullana – Perú) en el año 2010 utilizando el antígeno AMA-1?

1.2 ANTECEDENTES

Según estimaciones, en el 2010 ocurrieron 219 millones de casos de malaria (intervalo entre 154-289 millones) y 660 000 muertes (intervalo entre 490 000-836 000) a nivel mundial. Se estima que aproximadamente el 80% de los casos y el 90% de las muertes ocurren en la Región Africana, siendo los niños menores de cinco años de edad y las mujeres embarazadas los grupos de población más afectados (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2012).

Las herramientas seroepidemiológicas han demostrado ser valiosas para cuantificar los cambios a largo plazo en la transmisión de la malaria en numerosos lugares. Desde el punto de vista de monitoreo programático, la serología es relativamente rápida y eficiente; muestras de sangre del dedo-pinchazo se pueden recoger de forma rápida en grupos numerosos y los ELISAs son de alto rendimiento y fácilmente estandarizadas (Corran P, 2007) (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008).

La serología ofrece información sobre exposición acumulada a la infección y es menos sensible a las fluctuaciones estacionales (Wong J, 2014). Las respuestas de anticuerpos contra la malaria representan la historia de un individuo expuesto a la enfermedad y, como las tasas de seroconversión de edad, refleja la exposición acumulativa a malaria en una población. La respuesta de los anticuerpos es una medida alternativa de intensidad de transmisión de la malaria y tiene potencial en la evaluación de los cambios en la exposición. Este enfoque se utilizó en la década de 1970 para evaluar el control de la malaria y los intentos de erradicación en una variedad de diferentes entornos ecológicos. Estos estudios históricos proporcionan una gran cantidad de información sobre cómo los datos serológicos podrían ser utilizados para interpretar las medidas de control (Drakeley C, 2009).

Los Índices serológicos han demostrado su uso como una medida informativa adicional (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008).

Estas técnicas también han sido explotadas para documentar los cambios en la intensidad de la transmisión (Cook, y otros, 2011), las técnicas serológicas también han sido utilizadas para identificar "puntos calientes" (zonas con la más alta transmisión) de la malaria, como en los estudios realizados en Tanzania (Bousema T D. C., 2010) y Somalia (Bousema T Y. R., 2010) he, históricamente, para confirmar la eliminación en Grecia (Vakali A, 2012) y Mauricio (Bruce-Chawatt LJ, 1973) .

En estudios realizados en áreas de baja transmisión de la malaria, como Camboya, indicadores parasitológicos de intensidad de la transmisión o utilizando microscopía pueden ser insensibles. Medidas serológicas demostraron que los marcadores serológicos se pueden utilizar para detectar la heterogeneidad en la transmisión de la malaria, donde se produce la transmisión de la malaria en niveles demasiado bajos para ser detectados por microscopía (Cook, y otros, 2012).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general:

- Determinar la Prevalencia de Anticuerpos contra la malaria en los pobladores de localidades de Bellavista (Sullana – Perú) en el año 2010 utilizando el antígeno AMA-1.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia de anticuerpos IgG contra el antígeno AMA-1pf de *Plasmodium falciparum* en la población estudiada.
- Determinar la prevalencia de anticuerpos IgG contra el antígeno AMA-1pv de *Plasmodium vivax* en la población estudiada.
- Determinar la asociación entre la seropositividad y diversos factores socio-epidemiológicos en la población estudiada.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Las características que describe las localidades de Bellavista (Sullana-Perú) refleja un potencial lugar de estudio con enfoque seroepidemiológico por ser una zona de baja transmisión y sin base de datos entomológicos (Badu K, 2015). El uso de herramientas sensibles y accesibles que sean capaces de medir la exposición, podrían ser una fuente de información que explique la dinámica de exposición y los componentes asociados en un momento determinado (Rosas-Aguirre A, 2013).

La prevalencia de anticuerpos contra la malaria está asociado a la ecología local, la actividad humana, viviendas precarias y, en general, condiciones socioeconómicas que favorecen la exposición a la picadura (Hay SI, 2004)

El control de la malaria requiere flexibilidad de enfoque. Para la selección de intervenciones acertadas es necesario comprender la dinámica local y focal de la endemia. Es importante conocer la realidad del problema epidemiológico, medir la exposición con el empleo de técnicas serológicas que complementen las de rutina, e identificar factores de riesgo de exposición a malaria. Por todo lo expuesto se planteó esta investigación, para conocer las características de la exposición a malaria en las localidades de bellavista (Sullana – Perú).

1.5 Hipótesis

Existe prevalencia de anticuerpos contra la malaria en los pobladores de las localidades de Bellavista, asociada a la compleja interacción de riesgos individuales, ambientales, socio-económicos y culturales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 MALARIA EN EL MUNDO

Los datos publicados el 17 de setiembre del 2015, según la WHO-UNICEF, la tasa de mortalidad de malaria ha caído un 60% desde el año 2000, lo que se traduce en 6,2 millones de vidas salvadas, la gran mayoría niños. Por otro lado, un número creciente de países están al borde de la eliminación de la malaria. En el 2014, 13 países reportaron cero casos de la enfermedad y 6 países notificaron menos de 10 casos. Los decesos más rápidos fueron vistos en Asia central (World Health Organization, 2013).

A pesar de los enormes progresos, la malaria sigue siendo un problema grave de salud pública en muchas regiones. Solo en el 2015, había un estimado de 214 millones de nuevos casos de malaria, y aproximadamente 438,000 personas murieron de esta enfermedad prevenible y tratable. Alrededor de 3,2 millones de están en riesgo de malaria.

Algunos países siguen llevando una parte desproporcionadamente elevada de la carga mundial de la malaria. Quince países, principalmente en sub-Sahara África, que representaron el 80% de los casos de malaria y el 78% de las muertes a nivel mundial en el 2015.

Los niños menores de 5 años representan más de dos tercios de todas las muertes relacionadas con la malaria. Entre el 2000 y 2015, la tasa de mortalidad de malaria de los niños menores de 5 años se redujo en un 65% o un estimado de 5,9 millones de vidas infantiles salvadas (Organización Mundial de la salud, 2014).

2.1.2 MALARIA EN EL PERÚ

En el Perú, el número de casos de Malaria ha estado influenciado por diversos factores sociales, económicos y fenómenos climatológicos (Gagnon, 2002). En los últimos 5 años, más del 50% de los casos a nivel nacional se han reducido; sin embargo, sigue siendo un grave problema de salud pública.

La Región Amazónica que está integrada por los departamentos de: Amazonas, Loreto, San Martín, representan la mayoría de los

casos totales del país (Ministerio de Salud del Perú, 2015), El clima tropical se presenta como el principal factor de la alta incidencia de casos (Rosas-Aguirre. A, 2016).

En la Costa Norte, región conformada por los departamentos de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad, la enfermedad de la Malaria ha sido influenciada por fenómenos climatológicos como el fenómeno del Niño. Alcanzó su mayor incidencia en 1998 (más de 120.000 casos, más del 50% del total del país), luego de lo cual ha habido una disminución significativa del número de casos reportados, considerándose una zona sin riesgo (Ministerio de Salud del Perú, 2015).

2.1.3 CICLO BIOLÓGICO

El agente etiológico de la malaria es un protozooario del género *Plasmodium* y es transmitido por un vector (mosquito) del género *Anopheles* (Gutierrez, 2003) .

Existen cuatro especies de *Plasmodium* capaces de infectar al hombre: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*; en el Perú se han descrito las tres primeras.

El ciclo biológico del *Plasmodium* comprende tres fases

- **CICLO SEXUAL O ESPOROGÓNICO:** la transmisión natural de la enfermedad se produce cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* pica a un huésped infectado de malaria (ser humano), adquiere los gametocitos del *Plasmodium* (macho y hembra), los que ingresan al tubo digestivo del mosquito y luego de la fecundación se reproducen en la pared de éste hasta adquirir la forma infectante denominada esporozoíto. Estos esporozoítos son fusiformes, poseen un núcleo alargado y están desprovistos de pigmento malárico. Los esporozoítos pasan por todas partes del mosquito y algunos llegan a las glándulas

salivales, para ser transmitidos a otro huésped sano, en el momento de la picadura. La forma infectante del *Plasmodium* (esporozoíto) ingresa a la vía sanguínea del huésped, en donde permanecen aproximadamente media hora antes de penetrar células hepáticas. Esta fase dura de 14 a 20 días, dependiendo de factores ambientales.

- CICLO EXOERITROCÍTICO: Esta fase se inicia en los hepatocitos, donde los esporozoítos se reproducen en grandes cantidades hasta asumir la forma capaz de invadir los glóbulos rojos. En un segundo día de esta fase, en el interior de los hepatocitos se encuentran esquizontes tisulares que aumentan de volumen y se dividen para formar millares de minúsculos merozoitos. Esta fase tiene una duración promedio de 12 días.
- CICLO ERITROCÍTICO: Ocurre cuando los merozoitos se liberan del hígado, pasan en grandes cantidades a la sangre e invaden los glóbulos rojos produciendo su destrucción. Ello ocurre en 48 horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, y 72 horas en *P. malariae*. Esto quiere decir que cada 48 o 72 horas se reinicia un nuevo ciclo eritrocítico (trofozoíto - esquizonte - trofozoíto).

2.1.4 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de la malaria se realiza considerando las manifestaciones clínicas y la confirmación mediante la gota gruesa u otra prueba de laboratorio que demuestre la presencia del parásito (Gutierrez, 2003).

2.1.4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Las formas clínicas de la malaria se pueden dividir en:

Leve:

Frecuente en individuos parcialmente inmunes, quienes ya han tenido ataques de malaria, o en personas con buena respuesta inmediata del sistema inmune. En estos pacientes la fiebre no es muy alta y los síntomas, si los hay, son discretos. La parasitemia es baja, generalmente por debajo de 0,1% de glóbulos rojos infectados.

Moderada:

Es típica en individuos no inmunes, quienes presentan el característico paroxismo febril con períodos de frío, calor y sudor, la temperatura es alta, con aumentos en la crisis. Los síntomas generales son más intensos, con fuerte cefalea; además, presentan anemia moderada y una parasitemia que varía de 0,1% a 0,5%.

Grave y de urgencia:

Casi siempre se observan en las infecciones producidas por *P. falciparum*. Este tipo de malaria se presenta en individuos no inmunes, mujeres embarazadas y niños. El paciente mantiene una fiebre persistente, la cefalea es fuerte, el vómito es frecuente y puede presentarse delirio. Además, la anemia es intensa y pueden estar parasitados 2% a más de los eritrocitos.

2.1.4.2 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

- **DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO**

Consiste en el examen microscópico de la muestra de sangre para demostrar la presencia del parásito para lo cual se usa la técnica de coloración de giemsa, con la cual podemos observar la gota gruesa y el frotis.

- Gota gruesa:

Es una técnica de rutina y consiste en una muestra de una gota de sangre conformada por numerosas capas en su mayoría de glóbulos rojos, los que son deshemoglobinizados durante la coloración con giemsa. Esta concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en su interior en densidades bajas.

- Frotis:

Es una capa delgada, única de células sanguíneas, fijadas con metanol y coloreadas con giemsa, que facilitan la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos.

El examen en ambos casos (gota gruesa y frotis) se realiza con aumento de 1000x con aceite de inmersión.

- **DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO**

Abarca métodos inmunoserológicos que evalúan la inmunidad humoral y celular del huésped. La metodología es suficientemente sensible y específica para detectar las infecciones cuando la parasitemia es baja, además de ayudar a diferenciar infecciones pasadas de la actual.

Entre las técnicas que se encuentran para el inmunodiagnóstico de malaria tenemos: inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, pruebas inmunocromatográficas (Dipstick), hemaglutinación, radioinmunoensayo, etc. La prueba de ELISA no es de mucha utilidad en el diagnóstico clínico de un

paciente, su mayor aplicación es en estudios epidemiológicos.

2.1.5 FUENTE DE ANTÍGENO

En los primeros 60 años del siglo XX la obtención de antígeno para ensayos inmunológicos o de diagnóstico se realizaba a partir de especies de *Plasmodium* spp. que no infectaban humanos, bajo la premisa de la existencia de reactividad cruzada entre las diferentes especies (Eaton, 1939) (Eaton M. D., 1939). Diferentes investigadores obtenían los antígenos, no purificados, a partir de muestras de órganos o muestras de sangre de especies no humanas que se encontraban infectadas por especies de *Plasmodium* diferentes a *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* o *P. ovale* (Eaton M. D., 1939) (Voller, 1975).

Los parásitos principalmente usados eran *P. Knowlesi* (Eaton, 1939) (Eaton M. D., 1939), *P. lophurae* y *P. gallinaceum* (Lippincott, 1945). El primero infectaba naturalmente distintas especies de simios endémicos del sureste asiático; hasta que en 1965 se reportó este tipo de infección en humanos (Chin, 1965). A pesar de esto, *P. knowlesi* siguió siendo usado como fuente de antígeno para ensayos de diagnóstico o seroepidemiología pues la incidencia de infecciones debido a él era bastante baja a nivel mundial (Kagan, 1969). *P. lophurae* infecta naturalmente a faisanes, pero experimentalmente se indujo la infección a pollos y patos para la obtención de antígenos; *P. gallinaceum* infecta diversas especies de aves (Kielmann, 1970). Sin embargo, los resultados obtenidos con estos parásitos no siempre eran reproducibles por la baja especificidad de los antígenos usados. Más adelante, *P. vivax* y *P. falciparum* fueron aislados de individuos infectados. Cuando fue posible cultivar *P. falciparum*, se convirtió en una fuente importante de antígeno (Drakeley C,

2009). En el caso de *P. vivax*, debido a su ciclo biológico, aún no se ha desarrollado un método de cultivo de *P. vivax* a largo plazo. Sin embargo, cuando se originó la tecnología del DNA recombinante en 1973 tras el trabajo de David Jackson (Jackson, 1972), muchas áreas empezaron a desarrollarse con más fuerza. Por ejemplo: la producción de antígenos recombinantes, prevención y cura de anemia falciforme, producción de factores de coagulación, producción de insulina, producción de farmacéuticos recombinantes y terapia génica. La producción de antígenos recombinantes ha mejorado la reproducibilidad de técnicas serológicas.

Recientemente, los antígenos recombinantes han sido utilizados en estudios que tienen como objetivo evaluar la transmisión de una enfermedad y conocer la exposición de los individuos frente al agente etiológico (Druilhe, 1986) (Felicangeli, 2003) (Hardelid, 2008). En el caso específico de antígenos de *Plasmodium*, éstos han sido expresados en diferentes sistemas como *E. coli* (Enevold, 2007), *Pichia pastoris*, Baculovirus (Dodoo, 2008), entre otros.

2.1.6 OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Un factor que varía entre los diversos estudios que tienen como objetivo la medición de anticuerpos; ya sea con el fin de diagnosticar, evaluar la inmunidad adquirida o hacer estudios epidemiológicos, es la obtención de éstos.

En la primera mitad del siglo XX, los anticuerpos eran obtenidos de muestras frescas de suero. Para ensayos de diagnóstico, se colectaba suero de pacientes infectados y se enfrentaba contra el antígeno obtenido (Eaton M. D., 1939). Ensayos más recientes han utilizado plasma sanguíneo para evaluar la inmunidad adquirida a las diferentes especies de *Plasmodium*, en diferentes zonas del mundo (Dodoo, 2008) (Enevold, 2007).

Lo ideal es trabajar con suero fresco o congelado, pero las intervenciones se hacen en zonas que no necesariamente cuentan con el equipo adecuado para mantener una muestra de este tipo fresca (Discipline-specific Malaria Eradication Research Agenda, 2011).

Como método alternativo, en el 2008 Corran propuso el uso de muestras de sangre en papel filtro como fuente de anticuerpos para estudios seroepidemiológicos (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008). Sus resultados muestran que este método, menos invasivo, es útil para la colección de muestras que son obtenidas, por lo general, a partir de un pinchazo en el dedo con una lanceta, la sangre obtenida se impregna en un papel filtro y se deja secar por algunas horas. Cuando esté seco se almacena con desecante a temperatura ambiente o, de preferencia, a 4° grados. Para que estas muestras sean usadas en ensayos inmunológicos o moleculares es necesario que el suero sea eluido; para esto, un trozo del papel filtro es cortado en condiciones de esterilidad y enfrentado a una solución de PBS con algún detergente. En la actualidad, este es el método que se registra con mayor frecuencia en estudios de seroepidemiología (Kobayashi, Chishimba, Shields, Hamapumbu, & Mharakurwa, 2012), (Cook, y otros, 2012), (Bousema T Y. R., 2010), (Drakeley C, 2009). En el Perú, esta técnica fue usada por Kain en 1992 para obtener anticuerpos y realizar una caracterización serológica, mas no para estudiar el nivel de anticuerpos como herramienta epidemiológica (Fernandez, 1992). Hace algunos años, Chidi y colaboradores desarrollaron un estudio donde usaron un método comercial para coleccionar fluido oral como fuente de anticuerpos en un estudio seroepidemiológico. El estudio concluyó que el fluido oral es una fuente válida de anticuerpos contra *P. falciparum* en estudios de monitoreo de la transmisión de la enfermedad (Chidi, 2011). A pesar de estos resultados alentadores, hasta la fecha no se ha

reportado otro estudio que haya usado el fluido oral como fuente de anticuerpos.

2.1.7 MEDICIÓN DE LOS ANTICUERPOS

El primer ensayo inmunológico reportado fue el Test de Fijación del Complemento (TFC) en 1939 (Eaton M. D., 1939). El fin de esta prueba era ser usada como diagnóstico de la enfermedad (Drakeley C, 2009). Las características de este ensayo demandan el uso de un antígeno con baja actividad autocomplementaria; bajo contenido de material no específico al parásito; y alto contenido específico relativo al parásito de malaria. Esta prueba requiere la presencia de una reacción antígeno-anticuerpo en la que el consumo del complemento in vitro se puede utilizar para medir la actividad hemolítica del complemento con el fin de medir la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo formados en la reacción final.

Los ensayos de hemoaglutinación reemplazaron la técnica de TFC por requerir menor volumen de antígeno y ser más sensible. El ensayo de hematoaglutinación indirecta (HAI) se sustenta en la interacción entre anticuerpos cuando se unen al antígeno que, eventualmente, resultará en la degradación de glóbulos rojos. El resultado es dado por simple visión. El suero es probado a diferentes concentraciones; se reporta la dilución mayor con aglutinación como el título de anticuerpo (Siachoque H, 2006). Es posible procesar varias muestras al mismo tiempo en una placa de micro-pozos. Sin embargo, el resultado es subjetivo. La técnica es difícil de estandarizar y se reportan problemas de reproducibilidad; por lo tanto, la comparación de datos entre laboratorios es limitada (Drakeley C, 2009).

A partir de los años 60, en adelante, el ensayo de inmunofluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés) fue usada con frecuencia para determinar el título de anticuerpos presenta en un individuo. Ésta consiste en incubar suero de interés en una lámina porta-objetos previamente fijada con antígeno o parásitos enteros.

Se agrega anticuerpo secundario ligado a fluoróforos para detectar los anticuerpos unidos al antígeno fijado. Se evalúa la lámina en un microscopio de fluorescencia (Siachoque H, 2006). Una ventaja es el posible uso de parásitos enteros, sin necesidad de usar grandes volúmenes de antígeno purificado como lo requerían las técnicas previas. Además, es capaz de detectar títulos de anticuerpos menores a la HAI. Sin embargo, ambas técnicas son subjetivas por ser determinadas a simple vista y la estandarización no es posible (Drakeley C, 2009).

Actualmente, el ensayo de inmuno-absorbancia ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) es la técnica más usada a nivel mundial para detectar anticuerpos específicos a un antígeno (Cook, Reid, Iavro, Kuwahata, Taleo, & Clements, 2010), (Chidi, 2011), (Drakeley, y otros, 2005), (Enevold, 2007). El principio es el mismo que en IFA pero, en este caso, el antígeno se encuentra fijado en una placa de microtitulación de poliestireno. El ligando es una molécula capaz de adherirse al anticuerpo que está unida a una enzima como la peroxidasa u oxidasa. El ligando unido se visualiza mediante la adición de un sustrato incoloro el cual actúa como ligando de la enzima; finalmente, se obtiene un producto coloreado cuya intensidad es medida en un espectrofotómetro (Siachoque H, 2006). Esto permite que la técnica se pueda estandarizar y obtener varios resultados en solo pocos minutos. El ensayo es de costo moderado, en comparación con otras técnicas, y fácil de realizar. El primer ensayo de ELISA que detectó anticuerpos contra *P. falciparum* y *P. vivax* usando antígeno de *P. knowlesi* fue realizado por Voller y colaboradores (Voller, 1975).

La mayoría de estudios realizan medidas individuales de los anticuerpos específicos y luego determinan la exposición de la población frente al parásito. Sin embargo, en el 2010 Ambrosino y colaboradores desarrollaron por primera vez un ensayo de detección múltiple para 13 antígenos de *P. falciparum* para determinar la exposición de los individuos al parásito y además a

2 antígenos de *Anopheles gambiae* pues se ha reportado que el sistema inmunológico humano también responde a antígenos del mosquito (Ambrosino, y otros, 2010). La técnica desarrollada fue rápida, reproducible y requiere de poco volumen de suero. Por lo tanto, se describe como un método potencial para grandes barridos donde se cuente con poca muestra por cada individuo. Además, en el 2012 Jepsen y colaboradores determinaron el beneficio de usar un ensayo con múltiples antígenos frente a usar IFA para determinar la exposición de una persona (Jepsen, 2012). El ensayo múltiple se basa en el uso de microesferas y, en este estudio, tuvo mayor sensibilidad que el IFA y redujo la lectura a un solo valor.

También en el 2010, Crompton y colaboradores desarrollaron un microarreglo capaz de medir la respuesta humoral de las personas frente a 5400 proteínas del genoma de *P. falciparum* (Crompton, 2010). Ellos evidenciaron el gran aumento de anticuerpos en niños durante la época de alta transmisión. Sin embargo, la mayoría de estas respuestas fueron de corta duración pues no llegaron a prevalecer a lo largo de toda la temporada alta. Se evidenció el modesto incremento de anticuerpos a medida que aumenta la edad del individuo. Además, fue estadísticamente significativo los más altos niveles de anticuerpos en niños infectados con *P. falciparum* que no desarrollaron la enfermedad frente a los que sí la desarrollaron. Este método, además, puede dar mejor evidencia frente a la antigenicidad que tienen las proteínas de *Plasmodium spp.* frente al ciclo de vida en el que se encuentre.

2.1.8 VIDA MEDIA DE LOS ANTICUERPOS DE MALARIA

En el caso de malaria, diversos estudios han descrito la respuesta inmunológica humana que se desarrolla en presencia del parásito (Achtman, Bull, Stephens, & Langhorne, 2005). En el 2003, Barid y colaboradores reportaron que la aparición de anticuerpos contra

P. falciparum toma un periodo de 2 semanas después de ser reconocido por el sistema inmunológico (Baird, 2003). En el 2005, Achtman y colaboradores realizaron una revisión bibliográfica acerca de la vida de la respuesta inmunológica hacia los estadios en sangre de malaria. En este momento, es importante señalar que se describe como respuesta inmunológica a todo producto elaborado por el sistema inmunológico que tenga como fin la eliminación del agente etiológico. Esta respuesta incluye la producción de anticuerpos que pueden ser en niveles muy bajos para ser funcionales y los niveles adecuados para producir una respuesta. No obstante, conocer la vida media de la respuesta inmunológica humoral total, da información acerca de la vida media de los anticuerpos funcionales. Incluso se podría decir que la vida media de los anticuerpos no funcionales establece el tiempo mínimo de vida media que tendrían los anticuerpos funcionales.

Achtman señala que todos los estudios que busquen determinar el tiempo de vida de la respuesta inmunológica específica a malaria, deben considerar algunos factores críticos: diferenciación entre inmunidad anti-parasítica e inmunidad clínica, la edad del grupo de estudio y la continuidad de exposición al parásito; que influyen en la vida media que tendrá el anticuerpo. Además, señala que los niveles de anticuerpos caerán, según se reduzca la exposición al parásito (Achtman, Bull, Stephens, & Langhorne, 2005).

Por otro lado, en la revisión realizada por Achtman, se señala que algunas respuestas de anticuerpos específicas a malaria son de corta vida mientras que otras son persistentes. La diferencia de la vida media de los anticuerpos radica en la naturaleza del antígeno. Por esto, las observaciones son tan variables (Achtman, Bull, Stephens, & Langhorne, 2005).

Tras la infección, en ausencia de parásito, Abdel y Kinyanjui junto con sus colaboradores observaron que el nivel de anticuerpos

permanece constante por un periodo de 2 años en ausencia de re-infección (Abdel-Latif, Dietz, Issifou, Kremsner, & Klinkert, 2003) (Kinyanjui, Bull, Newbold, & Marsh, 2003). Incluso, en 1986, Druilhe reportó que anticuerpos contra el esporozoíto son capaces de persistir por 6 y 10 años después de que el individuo haya salido de una zona endémica (Druilhe, 1986). Más sorprendente aún es el caso reportado en Brasil por Braga y colaboradores donde a raíz de un brote de 50 días de *P. vivax*, se registraron anticuerpos específicos a la proteína del circunsporooito (CSP) hasta 7 años después de eliminado el brote (Braga, Fontes, & Krettli, 1998). Por esta evidencia, se puede decir que los anticuerpos pueden vivir por años a pesar de que no haya reinfección. Sin embargo, los estudios realizados por Braga, Druilhe, Abel y Kinyanjui no especifican cómo determinaron la ausencia de exposición al parásito. En base a esta evidencia, en el 2005, Drakeley propuso que los anticuerpos pueden ser mantenidos por hasta 50 años cuando la infección en ausencia de tratamiento antimalárico. Las infecciones sub-patantes, por ejemplo, pueden ser capaces de mantener estas respuestas. Además, indicó que la vida media de los anticuerpos específicos a *Plasmodium* spp. es al menos de 10 años (Drakeley, y otros, 2005).

Por otro lado, también existe evidencia de que los anticuerpos son de vida corta. Algunos anticuerpos se reducen en 66% entre los 3 y 9 meses después de eliminar la infección. La disminución de la prevalencia de anticuerpos es común tras eliminar al agente infeccioso. Sin embargo, se da con más rapidez tras eliminar a *Plasmodium* sp. en comparación con otros agentes infecciosos (Achtman, Bull, Stephens, & Langhorne, 2005).

Por otro lado, si se trata de una infección recurrente, como la que es provocada por *P. vivax* o *P. ovale*, el desarrollo de la respuesta inmunológica será diferente y debe también ser considerado cuando se quiera determinar la vida media de anticuerpos

específicos a malaria (Achtman, Bull, Stephens, & Langhorne, 2005). Esto, debido al característico ciclo biológico de ambos parásitos. Permanecer en el hospedero en estado de dormancia y producir infecciones recurrentes origina una situación donde el individuo estará continuamente expuesto al parásito. Aunque aún no se entiende su efecto sobre el desarrollo de anticuerpos, es importante considerar la peculiaridad de esta situación.

2.1.9 DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE

Los estudios de epidemiología basados en serología determinan si una muestra es sero-positiva o sero-negativa cuando el resultado se compara con el de una persona no expuesta previamente al antígeno o proteína blanco en cuestión. A estos individuos se les considera vírgenes ante dicho antígeno. Se calcula la media y desviación estándar de los individuos no expuestos. Luego, a la media se le suma 3 veces la desviación estándar y se determina al punto de corte.

Sin embargo, en una zona endémica de malaria, no es fácil identificar a individuos no expuestos previamente al parásito. Aunque algunos estudios usaron a personas sin historia previa de malaria como personas no expuestas al parásito (Ak, y otros, 1998). Con mayor frecuencia, se incluyen a individuos de regiones no endémicas de malaria para determinar el punto de corte (Baumann, y otros, 2012), (Cavanagh, y otros, 1998), (Drakeley, y otros, 2005) y (Kobayashi, Chishimba, Shields, Hamapumbu, & Mharakurwa, 2012), (Perraut, y otros, 1990). Por lo general, los individuos que residen en zonas no endémicas son de diferente etnicidad y viven en ambientes geográficos diferentes (Por ejemplo: Norte Americanos o Europeos). En consecuencia, la muestra usada para determinar el punto de corte no comparte la características genéticas y biológicas con la población a estudiar.

Por esto, la composición serológica que ellos tendrían no es comparable con la de la población de estudio.

Como método alternativo, en el 2008, Corran y colaboradores definieron que los valores de densidad óptica (O.D) de la población de interés se comportan como 2 subpoblaciones, dando como origen un modelo mixto (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008). En este modelo, con los resultados de los valores de densidad óptica se plotean 2 curvas gaussianas. Una de ellas representa a la subpoblación no expuesta (curva más angosta) y la otra a la subpoblación expuesta (curva más ancha). Por esto, a partir de la medición de una variable cualitativa que refleje el valor de O.D, es posible determinar 2 curvas Gaussianas. Tras obtener las curvas, se halla el promedio y desviación estándar de cada subpoblación. Luego, como se hace regularmente, se utiliza la media y desviación estándar de la subpoblación no expuesta. El número de veces que se suma la desviación estándar cambia según los estudios. Algunos utilizan 2 desviaciones estándar más de la media (Twhig, 2019) e incluso algunos determinan sueros super-positivos con el uso de 5 desviaciones estándar más a la media (Baumann, y otros, 2012). Sin embargo, por lo general se utilizan 3 desviaciones estándar pues representa el 99% de probabilidad de pertenecer a la población que modela esa distribución normal (Abu-Zeid, y otros, 2002).

El principio base se mantiene, pero se superan las limitaciones del método convencional donde el punto de corte se determinaba con respecto a otra población. Las características de esta población no necesariamente reflejaban la naturaleza de la población de interés. Por lo tanto, el uso de modelos mixtos supera esa limitación pues identifica a los verdaderos individuos no expuestos al parásito, en el área de estudio.

Finalmente, a partir de la publicación en el 2008 (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008) los modelos

mixtos fueron implementados en varios estudios sero-epidemiológicos para determinar el punto de corte. Se utilizó en Vanuatu (Cook, Reid, Iavro, Kuwahata, Taleo, & Clements, 2010), Cambodia (Cook, y otros, 2012), Somalia (Bousema T D. C., 2010) y la isla de Bioko (Cook, y otros, 2011).

2.1.10 FACTORES SOCIO-EPIDEMIOLÓGICOS

La relación de la condición de seropositividad de anticuerpos contra el parásito de malaria con otras variables, es un análisis que ayuda a asociar factores de riesgo en la población. Un factor de riesgo, es definido por la OMS como cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión (Organización Mundial de la salud, 2014). En los estudios sero-epidemiológicos se busca encontrar factores de riesgo asociados a la exposición de una persona frente al agente etiológico de malaria.

Diversos estudios han identificado factores de riesgo asociados a exposición en zonas de alta (Bioko), media y baja endemicidad (Cambodia) (Cook, y otros, 2012). Por ejemplo, Cook reportó que los niveles de anticuerpos, aumenta cuando las personas viajan a áreas de mayor endemicidad, tanto contra *P. vivax* y *P. falciparum*. Además, las personas que reportaron mayores ingresos económicos presentaron menor nivel de anticuerpos contra *P. falciparum* (Cook, y otros, 2012).

En el 2012, Baumann encontró que los títulos de anticuerpos específicos a GLURP son menores en personas que tienen mosquiteros. Sin embargo, no existe diferencia en los títulos de anticuerpos específicos a MSP3 entre las personas que usan mosquiteros o no (Baumann, y otros, 2012). Más interesante aún es que los niveles de anticuerpos no difieren entre los que usan frecuentemente los mosquiteros y el resto de la población. Por lo

tanto, la protección que confiere el mosquitero puede estar relacionada netamente con su uso permanente más no intermitente. Además, las personas que tuvieron casos de malaria previa, en un periodo de 12 años, tuvieron respuestas ligeramente positivas a ambos antígenos, demostrando la utilidad de los marcadores serológicos para identificar la exposición de una persona frente al parásito.

El género también ha sido estudiado. En el 2012, Pathak demostró por varios métodos estadísticos que después de la pubertad, los hombres tienen más riesgo a tener malaria clínica que las mujeres (tanto casos por *P. falciparum* como *P. vivax*). La misma se observa en ratones donde machos no expuestos a *Plasmodium* spp. son infectados y desarrollan la enfermedad mientras que las hembras no. Este modelo establece una clara relación donde la testosterona favorece el desarrollo de malaria mientras que los estrógenos se relacionan con resistencia a malaria. Sin embargo, aún no es concluyente. Otra posibilidad es el frecuente consumo de alcohol en varones que en mujeres. El consumo de alcohol afecta la funcionalidad del hígado, órgano importante en el desarrollo de respuesta inmune de los estados sanguíneos (Pathak, y otros, 2012).

Además, la cercanía de las personas a fuentes de agua también ha sido asociado a contribuir con la exposición a *Plasmodium* spp. Debido a que la enfermedad se transmite a través de mosquitos y que éstos se desarrollan en ambiente húmedos; en el 2012 Baumann y colaboradores concluyeron que las personas residentes en áreas cercanas a fuentes de agua tienen mayor riesgo a contraer la enfermedad (Baumann, y otros, 2012). Cabe mencionar que este estudio no se basa en el uso de marcadores serológicos sino en casos de malaria identificados por microscopía. En contraste, Wilson y colaboradores, encontraron que a medida que aumenta la distancia entre la residencia y el cuerpo acuoso, no se reducen los niveles de IgG3 en adultos. Sin embargo, en ese mismo estudio también concluye que no es

posible identificar patrones especiales de exposición con información serológica en adultos, solamente en niños (Wilson, y otros, 2007). Por lo tanto, a raíz de ambas observaciones no es posible concluir si los cuerpos acuosos verdaderamente son un factor de riesgo a *Plasmodium* spp.

En el 2009, tras un proceso de revisión bibliográfica, Protopopoff y colaboradores fueron capaces de establecer 3 categorías que explicaban el riesgo de contraer malaria. Para Protopopoff existen factores ambientales, biológicos, sociales-económicos y culturales cuya interacción aumenta el riesgo de estar infectado (Protopopoff, y otros, 2009) .Algunos han sido identificados como factores de riesgo en estudios previos, pero aquí Protopopoff buscó generalizar los hallazgos individuales bajo la premisa de que en cada zona la exposición a malaria varía según múltiples factores específicos a las características de la población o región.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Material de laboratorio

Equipos e instrumentos

- Lector de microplacas de ELISA (Chameleon V)
- Micropipeta simple y multicanal
- VortexGenie 2

Reactivos

- Antígeno: *Plasmodium falciparum* PfAMA-1
- Antígeno: *Plasmodium vivax* PvAMA-1
- anti-IgG humano (H+L) (Chemicon)
- Tampón Tris 0.125M pH 6.8
- PBS 0.01M pH 7.4
- PBS-Blotto 0.01M pH 7.4
- PBS-Tween 0.01M ph 7.4

- PBS-Blotto-Tween: 250 mL PBS-Blotto + 125 μ L Tween 20 (0.05%)
- Tampón ABTS (Roche)
- Tabletas de 50mg de ABTS (Roche)
- Agua

Materiales

- Placas de ELISA de 96 pozos (Costar)
- Tips para pipetas de 20 μ L, 200 μ L, 300 μ L y 1000 μ L

3.2 Material biológico

Muestra de sangre obtenida de personas residentes en 2 localidades (José Carlos Mariátegui, Esteban Pabletich) de la costa norte del Perú. A la cuales se les aplico un censo tal como se detalla en la tabla 1. La muestra de estudio incluye solamente residentes que aceptaron participar del estudio.

3.3 Ensayo de Elisa

El ensayo de ELISA usado se basa en el protocolo descrito previamente (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008). La utilidad de la serología para estimar exposición al parásito de la malaria, depende del hallazgo de marcadores serológicos adecuados (Drakeley, y otros, 2005). Se trabajó con antígenos PfAMA-1, una proteína recombinante expresada en la levadura metilotrónica *Pichia pastoris* (Roestenberg M, 2008) de *P. falciparum* y la proteína recombinante PvAMA-1 expresada en la bacteria *Escherichia coli* (Morais CG, 2006) de *P. vivax*.

Los anticuerpos se eluyeron en 2 mL de Solución Buffer Fosfato (PBS)-Blotto-Tween a partir de un disco de 5mm de diámetro de papel filtro que contenía la muestra de sangre, y que equivalía a una dilución de suero 1:400, aproximadamente. Los anticuerpos IgG contra ambos antígenos

se detectaron en ensayos independientes, empleando la metodología estándar del ensayo de ELISA indirecto.

Los antígenos utilizados, las proteínas recombinantes PfAMA-1 y PvAMA-1, se diluyeron en PBS a una concentración final de 2µg/mL, y se colocó 200 µL de la solución a cada pozo de placas de ELISA a 4°C durante toda la noche, por duplicado (paso 1, figura 1). Las placas se bloquearon usando 200 µL de PBS con 1% (peso/volumen) de leche en polvo a temperatura ambiente, durante 1 hora (paso 2, figura 1). Posteriormente, las placas se lavaron con 200 µL de PBS más Tween20 (PBS-T) al 0.05%. Se adicionó por duplicado 300 µL de muestra (preparada anteriormente) en cada pocillo de la placa para PvAMA-1 y PfAMA1 (paso 3, figura 1). Finalmente, las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Un grupo de muestras de suero hiperinmune, colectadas de 5 adultos residentes en áreas endémicas de Malaria, se incluyeron por duplicado como control positivo en cada placa para monitorear las variaciones entre las placas, en los diferentes días de procesamiento (diluido 1:400 en PBS-Bloto). También se incluyó suero de 5 adultos residentes en áreas no endémicas de Malaria, y que nunca fueron expuestos a la enfermedad como control negativo (diluido 1:400 en PBS-Bloto). Finalmente, en cada placa se incluyó pocillos sin muestra de suero como controles “blanco”.

Después, se removieron las muestras y se lavaron las placas 3 veces con 300 µL de PBS-T por pozo (paso 4, figura 1). Luego, se revelaron usando conjugado de peroxidasa de conejo anti-IgG humano (H+L) (Chemicon) diluido 1:5000 en PBS-T (paso 5, figura 1). Luego se removió el exceso de conjugado con 5 lavados con PBS-T (paso 6, figura 1). A cada pocillo de las placas se les agregó 200 µL de solución sustrato (ABTS + H₂O₂) el cual cambia de incoloro a verde cuando la reacción es positiva (paso 7, figura 1). Finalmente, las placas se leyeron a 415nm. (Lector Biotek, Synergy H1). Figura 1. Los valores de densidad óptica (O.D, por sus siglas en inglés) registrados se almacenaron.

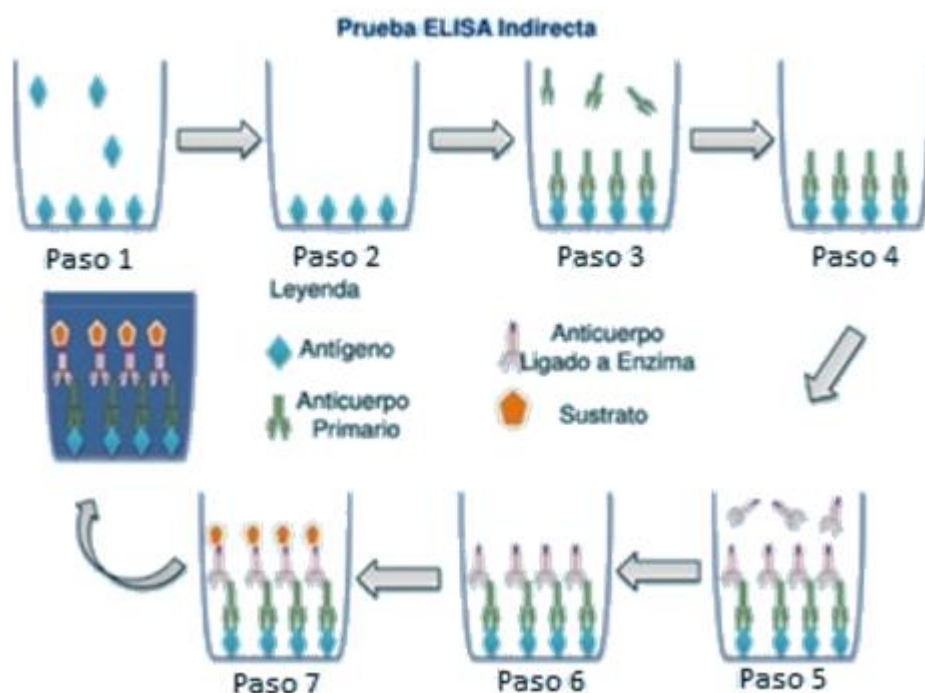


Figura 1. Prueba de ELISA indirecto.

3.4 Proceso de recolección de datos

Las muestras se obtuvieron de 1925 personas, visitando cada casa de en el distrito de Bellavista. Éste es uno de los 8 distritos de la Provincia de Sullana, ubicado en el departamento de Piura, donde habitan aproximadamente 36,680 personas. Su Longitud Oeste es de 80°40'48, su Latitud Sur es 04°53'57, y se encuentra a una altura de 40 msnm.

Se incluyó en el estudio 2 localidades del distrito de Bellavista, Jose Carlos Mariategui (JCM) y Esteban Pavletich (EP) entre los meses de Mayo y Junio del año 2010.

En cada casa se solicitó permiso al jefe de familia para realizar la toma de exámenes pertinentes y llenar las encuestas epidemiológicas a todos los miembros del lugar, previa firma del Consentimiento Informado para adultos, y asentimiento informado y consentimiento de padres en caso de menores de edad. Por si algún miembro de la casa no hubiese estado presente al momento de realizar el censo, se visitó la vivienda en 2 oportunidades adicionales con el fin de captar a aquellos miembros ausentes.

Se excluyó del estudio a todas las personas que no residían en el área de estudio, aquellos que no firmaron el consentimiento informado o que no cumplieron con los requisitos de inclusión: presentar desnutrición severa, desórdenes neuropsiquiátricos o antecedentes como epilepsia o demencia.

Finalmente, se tomó una muestra de sangre para realizar evaluaciones por microscopía (gota gruesa y frotis) y estudios serológicos (Papel filtro Whatman de grado 3, Whatman, Springfield Mill, EEUU). Una vez secas las muestras en papel filtro, se guardaron en bolsas plásticas con desecante, y almacenadas a 4° C bajo oscuridad, en un ambiente del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, para luego ser procesadas. En este estudio se incluyeron 1925 muestras de papel filtro (tabla 1)

Tabla 1

Número de muestras recolectadas

<i>Localidad</i>	<i>Censo</i>	<i>Encuestas Epidemiológicas</i>	<i>Muestras en papel filtro</i>
<i>José Carlos Mariátegui</i>	<i>1364</i>	<i>799</i>	<i>797</i>
<i>Esteban Pabletich</i>	<i>2092</i>	<i>1131</i>	<i>1128</i>
<i>Total</i>	<i>4585</i>	<i>2673</i>	<i>1925</i>

3.5 Plan de análisis de datos

3.5.1 Análisis de seropositividad

Las OD corregidas fueron calculadas restando la media del OD de los controles negativos para cada una de los valores obtenidos de cada pozo. Para asegurar la estandarización de las muestras entre las placas de ELISA se calculó el porcentaje de positividad (PP) de cada antígeno usando el OD del control positivo como el 100%.

El punto de corte de positividad fue generado usando el modelo mixto descrito por Corran (Corran, y otros, 2008). El modelo define puntos de cortes para pruebas diagnósticas a nivel poblacional sin gold estándar que compare los resultados. Consiste en ajustar la distribución normalizada de las densidades ópticas a la suma de dos distribuciones gaussianas usando métodos de máxima verosimilitud. La distribución de los resultados seronegativos es más angosta y la de seropositivos es más amplia. El punto de corte es definido a tres desviaciones estándar más de la media del PP de los seronegativos.

3.5.2 Operacionalización de variables

Seropositividad: Para el presente estudio, un individuo seropositivo fue definido como aquel que excede el punto de corte (definido por el modelo mixto) en al menos uno de los antígenos analizados (PvAMA-1 o PfAMA-1).

Seronegatividad: Un individuo seronegativo fue definido como aquel que no excede el punto de corte (definido por el modelo mixto) en ambos antígenos (PvAMA-1 y PfAMA-1).

3.6 Descripción de variables

En base a los objetivos específicos señalados, las variables usadas en este estudio se detallan en la tabla 2. En la parte superior de la tabla están las variables que permiten determinar la prevalencia de anticuerpos específicos a *P. falciparum* y *P. vivax*. En la segunda parte de la tabla están todas las variables socio-epidemiológicas analizadas para identificar los factores de riesgo asociados a estar expuestos a malaria.

Tabla 2*Variables utilizadas en el estudio.*

Nombre de la variable	Características de la variable	Escala de medición
Variables utilizadas para determinar la prevalencia de anticuerpos específicos		
Porcentaje de positividad a PvAMA-1	Cuantitativa y discreta	Consignar número
Porcentaje de positividad a PfAMA-1	Cuantitativa y discreta	Consignar número
Seropositivo a PvAMA-1	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Seropositivo a PfAMA-1	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Seropositivo al menos a 1 antígeno	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Seropositivo a ambos	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Variables utilizadas para determinar factores de riesgo asociados a exposición		
Género	Cualitativa, dicotómica y nominal.	1=masculino, 0=femenino
Edad	Cuantitativa y continua.	Consignar número en años
Grupo de edades	Cualitativa y nominal.	1= de 0.5 a 5 años; 2= de 6 a 10 años; 3= de 11 a 19 años; 4= de 20 a 39 años; 5= de 40 a más
Nivel de instrucción	Cualitativa y nominal.	0=no sabe leer, ni escribir; 1=primaria 2=secundaria; 3=superior
Historia de malaria	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Tiene ingresos por persona	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Trabajó en chacra el último año	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí

Trabajó como obrero el último año	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Trabajó como comerciante el último año	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí
Trabajó como mototaxista el último año	Cualitativa, dicotómica y nominal.	0=No, 1=Sí

3.7 Análisis de datos

La base de datos fue generada en Excel, y analizada usando el paquete estadístico STATA. Los resultados son expresados en frecuencias absolutas y relativas. Se evaluó el riesgo de ser seropositivo en relación a los siguientes factores como: comunidad a la que pertenecen, distancia al tren, genero, edad, educación, actividad económica, ingreso mensual, trabajo como agricultor, trabajo como moto taxista en el último año y episodios en el último año. Para el análisis de asociación de factores de riesgo a exposición, no se incluyeron niños menores de medio año porque aún no producen una respuesta inmunológica propia, sino que reciben los anticuerpos maternos.

En el análisis bivariado con la variable dependiente (serología positiva), se tabuló cada característica según su condición de seroprevalencia. Después de obtener las frecuencias absolutas y relativas, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y la regresión logística simple entre la variable dependiente (seroprevalencia) y las variables independientes (factores socio-epidemiológicos).

Posteriormente todas las variables independientes que resultaron significativas en la regresión logística bivariada, con un $p < 0.2$, fueron ingresadas a un análisis de regresión logística multivariado a fin de identificar las variables que verdaderamente se encontraban independientemente asociadas a la seropositividad para malaria. El análisis se ajustó considerando las características del muestreo,

tomando a la vivienda como unidad primaria de muestreo y a las comunidades como estrato.

3.8 Consideraciones éticas

El presente estudio utilizó información colectada del estudio “**Dinámica de Transmisión de la Malaria en la Costa Norte peruana**” (DTMCN, Código SIDISI: 056736), el cual contó con la aprobación respectiva del Comité Institucional de Ética de la Universidad Cayetano Heredia (CIE-UPCH).

4. RESULTADOS

4.1 Características de la población de estudio

En la muestra total, la mayoría de datos provienen de EP (58.6%) y son mujeres (60.42%). Además, los grupos etarios se encuentran distribuidos así: 16.47% (317) niños menores de 6 años; 13.71% (264) entre los 6 y 10 años de edad; 18.29% (352) entre los 11 y 19 años de edad; 33.4% (636) entre los 20 y 39 años de edad y 18.49% (356) mayores de 40 años. Además, de todos los encuestados, 18.49% indicó no saber leer ni escribir; 39.53% tener educación primaria; 34.96% tener educación secundaria y 7.06% tener educación superior. Sin embargo, esta información también incluye a recién nacidos y niños menores de 5 años, para cuya edad no se espera sean capaces de leer y/o escribir en su totalidad. Por esto, no se puede hacer conclusiones respecto a la educación de la muestra.

Respecto a las características económicas de la muestra, 75.32 % indicó no recibir ningún sueldo mientras que 10.03% indico recibir menos a 650 soles mensual y el 12.36% igual o más a 650 soles. Sin embargo, estos datos estadísticos incluyen personas no aptas para trabajar (niños, estudiantes y personas retiradas). Según la actividad económica que

realizan con frecuencia son: ama de casa (26.49%), obrero (7.48%), comerciante (9.92%), mototaxista (2.7%) y agricultor (1.82%). Las personas que reportan haber trabajado como agricultor, mototaxista en el último año son 2.75%, 2.81%, respectivamente.

Por otro lado, en esta zona de baja transmisión de la enfermedad, 87.69% indicó no haber tenido un episodio de malaria nunca en su vida mientras que 10.86% dijo sí haber tenido al menos un episodio y el 1.85% indico haber tenido 2 o más episodios.

Tabla 3

Factores socio-epidemiológicos analizados en el estudio.

Característica	Descripción	n	%
Características socio-económicas			
Comunidad	Esteban Pavletich (EP)	1128	58.6
	José Carlos Mariategui (JCM)	797	41.4
Distancia del tren	<100	689	35.79
	100-250	1053	54.70
	>250	183	9.51
Género	Femenino	1163	60.42
	Masculino	762	39.58
Grupos de edades (años)	0 – 5	317	16.47
	6 – 10	264	13.71
	11 – 19	352	18.29
	20 – 39	636	33.4
	>=40	356	18.49
Educación	No sabe leer ni escribir	354	18.39
	Primaria	761	39.53
	Secundaria	673	34.96
	Superior	136	7.06
	Datos perdidos	1	0.05
Ingreso económico	ninguno	1450	75.32
	<650	193	10.03
	>=650	238	12.36
	Datos perdidos	44	2.29

Actividad económica	Ninguna (Niños, estudiantes, personas retiradas, datos perdidos)	911	47.32
	Agricultor	35	1.82
	obrero	144	7.48
	mototaxista	52	2.7
	Comerciante	191	9.92
	ama de casa	510	26.49
	Otro	73	3.79
En los últimos 12 meses trabajó como:			
Agricultor	No	1872	97.25
	Sí	53	2.75
Mototaxista	No	1871	97.19
	Sí	54	2.81
Características epidemiológicas:			
Historia de Malaria	No	1688	87.69
	1 episodio	209	10.86
	2 o más episodios	28	1.45

Nota: n= número de muestras.

4.2 Prevalencia de anticuerpos contra el parásito

Después de saber las características basales de la muestra, se procedió a calcular la prevalencia de personas con anticuerpos específicos a cada parásito de malaria. Para esto, primero se calculó el porcentaje de positividad de cada muestra, para luego establecer si es mayor o menor al punto de corte que se determinó con anterioridad.

Para determinar la prevalencia, se reportaron resultado de 1856 muestras para el antígeno PfAMA-1 y 1863 muestras para el antígeno PvAMA-1 de las 1925 muestras totales con las que se contaba. La prevalencia de anticuerpos contra PfAMA-1 (158/1856) es de 8.51%, con un intervalo de confianza de 7.3% a 9.91%. Por otro lado, la prevalencia de anticuerpos contra PvAMA-1 (294/1863) es de 15.78% con un intervalo de confianza de 14.07% y 17.65% (Tabla 4: Seroprevalencia según antígeno).

Tabla 4

Seroprevalencia de PfAMA y PvAMA.

Antígeno	Prevalencia	IC al 95%	Muestra	Población
----------	-------------	-----------	---------	-----------

PfAMA-1	8.51	7.3 - 9.91	158	1856
PvAMA-1	15.78	14.07 – 17.65	294	1863

Nota: IC = Índice de confianza

4.3 Factores de riesgo asociados a la exposición al parásito

Tras determinar qué muestras eran seroprevalentes y cuáles no, se pasó a analizar la asociación de ser seroprevalente con diversos factores socio-epidemiológicos. Para este análisis se tomaron las consideraciones descritas previamente.

4.3.1 Factores asociados a *P. vivax*

Los factores de riesgo se identificaron usando una regresión logística simple (Tabla 5: Factores de riesgo para la exposición a *P. vivax* – Análisis bivariado), considerando 95% de confianza. Se identificó la edad, el nivel de instrucción, la distancia de la casa al dren, tener ingreso económico, haber tenido episodio previo de malaria y ser agricultor o mototaxista como factores independientemente asociados a la exposición por *P. vivax*.

Tabla 5

Factores de riesgo para la exposición a P. vivax – Análisis bivariado.

Factor	Categoría	Seropositivo n (%)	N	OR	IC al 95%
Comunidad	EP	130 (11.95%)	1088	1*	
	JCM	164 (21.16%)	775	1.98	1.5 - 2.59
Grupo de Edades	0 – 5	9 (3.08%)	292	1*	
	6 – 10	18 (6.98%)	258	2.36	1.03 - 5.38
	11 – 19	46 (13.29%)	346	4.82	2.14 - 10.85
	20 – 39	126 (20.42%)	617	8.07	3.78 - 17.21

	Más de 40 años	95 (27.14%)	350	11.71	5.3 - 25.88
Género	Femenino	189 (16.79%)	1126	1*	
	Masculino	105 (14.25%)	737	0.82	0.64 - 1.05
Nivel de Instrucción	No lee ni escribe	23 (6.99%)	329	1*	
	Primaria	127 (17.07%)	744	2.74	1.64 - 4.57
	Secundaria	121 (18.47%)	655	3.01	1.82 - 5
	Superior	22 (16.42)	134	2.61	1.36 - 5
Distancia de la casa al dren	<100	69 (10.27%)	672	1*	
	100 – 250 m.	179 (17.69%)	1012	1.88	1.36 - 2.59
	>250	46 (25.7%)	179	3.02	1.89 - 4.82
Ingreso Económico	No	190 (13.54%)	1403	1	
	Si (< 650 PEN)	41 (21.93%)	458	1.79	1.22 - 2.64
	Si (≥ 650 PEN)	56 (24.03%)	233	2.02	1.44 - 2.83
Tuvo episodio previo de malaria	No	217 (13.31%)	1630	1*	
	1 episodio	62 (30.24%)	205	2.83	2.01 - 3.95
	2 o mas episodios	15 (53.57%)	28	7.51	3.53 - 15.94
En los últimos 12 meses, trabajó como:					
Agricultor	No	277 (15.3%)	1810	1*	
	Sí	17 (32.08%)	53	2.61	1.34 - 5.08
Motocarrista	No	281 (15.51%)	1812	1*	
	Sí	13 (25.49%)	51	1.86	1 - 3.47

Nota: OR= Odds Ratio; 1*= Ausencia de asociación, IC = Índice de confianza.

Luego, los factores que mostraron significancia fueron incluidos en un modelo de regresión logística multivariada, ajustado a las condiciones de la encuesta (Tabla 6: Factores de riesgo para la exposición a *P. vivax* – Análisis multivariado). Tras este análisis, resultó que los individuos que viven en la localidad de JCM

tienen 2,07 mayor probabilidad de estar expuestos al parásito en comparación a los residentes de la localidad de EP, por otro lado los individuos con intervalos de edades de 6 a 10 años, 11 a 19 años, 20 a 39 años, y aquellos mayores de 40 años tuvieron respectivamente 2.58, 5.48, 8.83 y 16.03 mayor probabilidad de haber sido expuestos a *P. vivax* cuando se le comparó con los menores de 5 años. Además, los individuos que viven a una distancia entre 100 y 250 metros del dren tienen 1.88 mayor probabilidad de estar expuesto al parásito, mientras que si la persona vive a menos de 100 metros pues el riesgo es 2.82 veces mayor, en comparación con las personas que viven a más de 250 metros del dren.

Tabla 6

Factores de riesgo para la exposición a P. vivax – Análisis multivariado.

Factor	Categoría	OR ajustado	IC al 95%
Comunidades	EP	1*	
	JCM	2.07	1.56 - 2.77
Grupo de Edades	0 – 5	1*	
	6 – 10	2.58	1.11 - 5.96
	11 – 19	5.48	2.40 - 12.49
	20 – 39	8.83	4.07 - 19.14
	Más de 40 años	16.03	7.01 - 36.61
Distancia de la casa al dren	>250 m.	1*	
	100 – 250 m.	1.88	1.37 - 2.60
	<100 m.	2.82	1.73 - 4.63

Nota: OR= Odds Ratio; 1*= Ausencia de asociación, IC = Índice de confianza.

4.3.2 Factores asociados a *P.falciparum*

Para identificar los factores de riesgo asociados a ser seropositivo, se realizó una regresión logística simple (Tabla 7: Factores de riesgo para la exposición a *P. falciparum* – Análisis univariado). Tras este análisis, la comunidad en la que se vive, la edad, el nivel de instrucción y haber trabajado como agricultor o mototaxista en el último año se presentan como variables asociadas a la exposición a *P. falciparum*.

Tabla 7

Factores de riesgo para la exposición a P. falciparum – Análisis univariado.

Factor	Categoría	Seropositivo n (%)	N	OR	IC al 95%
Comunidad	EP	95 (8.79%)	1081	1*	
	JCM	63 (8.12%)	775	0.92	0.64 - 1.3
Grupo de Edades	0 – 5	16 (5.52%)	290	1*	
	6 – 10	9 (3.49%)	258	0.62	0.28 - 1.38
	11 – 19	14 (4.08%)	343	0.73	0.35 - 1.51
	20 – 39	72 (11.67%)	617	2.26	1.31 - 3.89
	Más de 40 años	47 (13.51%)	348	2.67	1.49 - 4.79
Género	Femenino	106 (9.46%)	1120	1*	
	Masculino	52 (7.07%)	736	0.72	0.51 - 1.03
Nivel de Instrucción	No lee ni escribe	22 (6.75%)	326	1*	
	Primaria	59 (7.96%)	741	1.19	0.73 - 1.94
	Secundaria	66 (10.09%)	654	1.55	0.95 - 2.53

	Superior	11 (8.21%)	134	1.23	0.58 - 2.6
Distancia de la casa al dren	<100	54 (8.04%)	672	1*	
	100 – 250 m.	78 (7.76%)	1005	0.96	0.67 - 1.37
	>250	26 (14.53%)	179	1.94	1.13 - 3.35
Ingreso Económico	No	100 (7.18%)	1392	1*	
	Si (< 650 PEN)	25 (13.09%)	191	1.94	1.21 - 3.11
	Si (≥ 650 PEN)	29 (12.55%)	231	1.85	1.20 - 2.86
Tuvo episodio previo de malaria	No	130 (8%)	1624	1*	
	1 episodio	23 (11.27%)	204	1.46	0.91 - 2.23
	2 o mas episodios	5 (17.86%)	28	2.5	0.95 - 6.55
En los últimos 12 meses, trabajó como:					
Agricultor	No	150 (8.32%)	1803	1	
	Sí	8 (15.09%)	53	1.95	0.89 - 4.27
Mototaxista	No	151 (8.37%)	1805	1	
	Sí	7 (13.73%)	51	1.74	0.76 - 3.95

Nota: OR= Odds Ratio; 1*= Ausencia de asociación, IC = Índice de confianza.

Estos factores fueron incluidos luego en una regresión logística múltiple (Tabla 8: Factores de riesgo para la exposición a *P. falciparum* – Análisis multivariado). Como resultado los pobladores que tienen entre 11 y 19 años, tienen 2.65 mayor probabilidad de estar expuestos a *P. falciparum* que los niños menores de 5 años. Así mismo, tener entre 20 y 39 años tiene 3.6 mayor riesgo de estar expuesto a *P. falciparum*.

Tabla 8

Factores de riesgo para la exposición a P. falciparum – Análisis multivariado.

Factor	Categoría	OR ajustado	IC al 95%
Grupo de Edades	0 – 5	1*	
	6 – 10	0.8	0.41 - 1.57
	11 – 19	2.65	1.64 - 4.28
	20 – 39	3.6	2.13 - 6.09
	Más de 40 años	0.76	0.17 - 3.47

Nota: OR= Odds Ratio; 1*= Ausencia de asociación, IC = Índice de confianza.

5. DISCUSIÓN

En este estudio se determinó la prevalencia de personas con anticuerpos específicos a *P. vivax* y *P. falciparum* en una zona periurbana de la costa norte peruana. Aunque *P. vivax* fue predominante, la seroprevalencia mostró que la exposición a *P. falciparum* todavía ocurre en el área de estudio. A pesar que no se han reportado casos de malaria causados por *P. falciparum* desde el 2007. Además, se identificó que uno de los factores de riesgo a la exposición de *P. falciparum* fue la edad, los individuos de entre las edades de 11 a 39 años tienen mayor probabilidad a la exposición. Por lo tanto, este hallazgo refleja que la presencia de *P. falciparum* en la zona ha disminuido, sin embargo, aún está latente. Lo que podría sugerir que hay presencia de individuos asintomáticos, que funcionarían como reservorios del parásito (Ministerio de Salud Perú, 2014). Otra explicación podría ser la presencia de anticuerpos de reacción cruzada con *P. vivax* o antígenos de otros agentes etiológicos (Igonet S, 2007).

Por otro lado, la distancia al dren, la edad de los individuos y la comunidad a la que pertenecen son factores de riesgo asociados a *P. vivax*. En este estudio, se encontró que es más probable presentar anticuerpos específicos contra *P. vivax* y *P. falciparum* a medida que aumenta la edad.

Como refleja este estudio, *P. vivax* es un parásito que permanece cerca al dren. Este dren es un cuerpo acuoso que deriva del río Chira y funciona como un punto de acopio de los desechos de basura. Además, se concluyó que la cercanía del dren no está asociado a mayor exposición a *P. vivax* en los niños, caso contrario en los adultos, ya que la seropositividad fue significativa. Por otro lado, el principal vector de malaria en la costa norte es *Anopheles albimanus*. Naturalmente, se ha encontrado *A. albimanus* infectado por *P. vivax* y *P. falciparum*. Por lo tanto, es capaz de transmitir ambos parásitos. Esto explicaría por qué el vivir más cerca al río, aumenta el riesgo de exposición a *P. vivax*.

Lo interesante, es que, en este estudio, en el caso de *P. falciparum*, la distancia de la casa al dren no es estadísticamente significativa. Por lo tanto, es otro indicio que refleja la heterogeneidad de la transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum* en la zona. Específicamente indica que *P. falciparum* está disminuyendo en la zona, pero su vector sigue presente. Sin embargo, es necesario evaluar la estabilidad de *A. albimanus* en la región antes de establecer esta premisa como conclusión.

Los resultados obtenidos corroboran los hallazgos de Rosas, que los factores de riesgo como la edad, la distancia de los hogares al dren están asociados a la exposición de malaria (Rosas-Aguirre A, 2013), el cual se desarrolló en las mismas localidades pero usando diferentes marcadores serológicos, lo que nos sugiere que el uso de diferentes marcadores serológicos en una misma área reforzarían la información obtenida con solo dos marcadores, ya que el número de antígenos utilizados podría ser una limitante en el estudio. Por otro lado, la presencia de mayor prevalencia de anticuerpos contra *P. vivax* en la localidad de Jose Carlos Mariategui (JCM), también fue encontrada en el estudio Rosas (Rosas-Aguirre. A, 2016), en ese estudio se utilizaron dos marcadores PvAMA1 y PvMSP1-19, para hallar hotspots (puntos calientes de exposición), el hecho de que la localidad de JCM se encuentre cerca al dren y que la cercanía del dren sea un factor de riesgo asociado a la exposición a *P. vivax*, sugiere que el dren podría ser un criadero de mosquitos.

En conclusión, los marcadores serológicos, están reflejando el cambio en la transmisión de la enfermedad y esto es detectable a través de la regresión

logística, un método fácil de aplicar. Otros estudios se basan en las tasas de seroconversión para llegar a conclusiones como éstas (Cook, y otros, 2010), (Cook, y otros, 2011).

En este estudio, se evidencia que a medida que pasen los años, se incrementa el riesgo a ser seropositivo. Para el caso de *P. vivax*, el riesgo incrementa a partir de los 6 años de edad. Para el caso de *P. falciparum*, el riesgo aumenta a partir de los 11 años de edad. Ambos resultados reflejan cambios en la exposición, pero sobre todo indica que las personas, a pesar de no reportar casos de malaria, están expuestas a él. Por lo tanto, existe exposición constante al parásito y son necesarias medidas de prevención para evitar el aumento del número de casos y, finalmente, llegar a la etapa de eliminación de malaria.

6. CONCLUSIONES

- De los resultados obtenidos hemos probado que los marcadores serológicos dan información útil en zonas de baja transmisión como lo es la costa norte peruana, con ausencia de casos reportados.
- Hemos encontrado que *P. falciparum* aún está presente en la región estudiada, lo cual nos lleva a concluir que posiblemente también en otras zonas que ya no reporten la enfermedad.
- Se ha demostrado que en la zona estudiada los pobladores siguen expuestos al parásito de la Malaria.
- En el estudio de las localidades de Sullana se encontró que los pobladores de la localidad de José Carlos Mariátegui presentan mayor seroprevalencia a *P. vivax*, esto está asociado a la distancia de la vivienda al dren y la edad del individuo.

7. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se recomienda:

- Realizar mayor investigación en zonas donde no se reportan casos de la presencia del parásito de la malaria.
- Utilizar un mayor número de antígenos que reporten presencia de anticuerpos acumulados en el tiempo y los recién adquiridos, para diferenciar los casos de infecciones recientes como por ejemplo proteínas de la membrana de los esporozoítos CS (circunsporozoito). De esta forma mejorar el manejo y control de la Malaria en zonas de baja transmisión.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ministerio de Salud del Perú. (2015). *DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA*. Lima: www.dge.gob.pe.
- Abdel-Latif, M., Dietz, K., Issifou, S., Kremsner, P., & Klinkert, M. (2003). Antibodies to Plasmodium falciparum reifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. *Infective Immunology*, 6229-6233.
- Abu-Zeid, Y., Alwash, R., Shaheen, H., Bin-Othman, S., Lukic, M., Amiri, K., y otros. (2002). Seroprevalence of antibodies to repetitive domains of Plasmodium vivax circumsporozoite protein in United Arab Emirates children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 560-564.
- Achtman, A., Bull, P., Stephens, R., & Langhorne, J. (2005). Longevity of the Immune Response and Memory to Blood-Stage Malaria Infection. *CTMI*, 71-102.
- Ak, M., Jones, T., Charoenvt, Y., Kumar, S., Kaslow, D., Maris, D., y otros. (1998). Humoral immune responses against Plasmodium vivax MPS1 in humans living in a malaria endemic area in Flore, India. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicina and Public Health*.
- Alemu, K. A. (2013). "Malaria Infection Has Spatial, Temporal, and Spatiotemporal Heterogeneity in Unstable Malaria Transmission Areas in Northwest Ethiopia." Edited by Delmiro Fernandez-Reyes. *PLoS ONE*, 8 (11):e79966.
- Ambrosino, E., Dumoulin, C., Orlandi-Pradines, E., Remoue, F., Toure-Baldé, A., Tall, A., y otros. (2010). A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 Plasmodium falciparum and Anopheles gambiae saliva antigens. *Malaria Journal*.
- Amoran, O. E. (2014). "The Influence of Environmental Sanitation on Prevalence of Malaria in a Rural Town in South-Wetern Nigeria." *Nigerian Journal of Medicine: Journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria*, 23 (3): 254-62.
- Badu K, G. B. (2015). Serological evidence of vector and parasite exposure in Southern Ghana: the dynamics of malaria transmission intensity. *Parasite & Vectors*.
- Baird, J. K. (2003). "Onset of Clinical Immunity to Plasmodium Falciparum among Javanese Migrants to Indonesian Papua." *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97 (6):557-64.

- Baumann, A., Magris, M., Urbaz, M.-L., Vivas-Maritz, S., Durán, R., Nieves, T., y otros. (2012). Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan amazon. *Malaria Journal* .
- Bousema T, D. C. (2010). Identification of Hot Spots of Malaria Transmission for Targeted Malaria Control. *The Journal of infectious Diseases* , 201(11): 1764-74.
- Bousema T, Y. R. (2010). Serologic Markers for Detecting Malaria in Areas of Low Endemicity, Somalia, 2008. *Emerging Infectious Diseases* , 16(3):392-9.
- Braga, E., Fontes, C., & Krettli, A. (1998). Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to Plasmodium vivax . *Journal of Infectious Diseases* , 1132-1135.
- Bruce-Chawatt LJ, D. C. (1973). Seroepidemiological evidence of eradication of Malaria from Mauritius. *the Lancet* , 302(7828): 547-51.
- Buffet, P. A.-P. (2011). "The Pathogenesis of Plasmodium Falciparum Malaria in Humans: Insights from Splenic Physiology." *Blood* , (2): 381-92.
- Cavanagh, D., Elhassan, I., Roper, C., Robinson, J., Giha, H., Holder, A., y otros. (1998). A longitudinal study of type-specific antibody responses to Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *The Journal of Immunology* .
- Chidi, A. P. (2011). "Validation of Oral Fluid Samples to Monitor Serological Changes to Plasmodium Falciparum: An Observational Study in Southern Zambia." *Malaria Journal* , 10 (1):162.
- Chin, W. P. (1965). "A NATURALLY ACQUIRED QUOTIDIAN-TYPE MALARIA IN MAN TRANSFERABLE TO MONKEYS." *Science (New York, N. Y)* , 149(3686):865.
- Cook, J., Kleinschmidt, I., Schwabe, C., Nseng, G., Bousema, T., Corran, P., y otros. (2011). Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea. *PLoS One* , 6(9): e25137.
- Cook, J., Reid, H., Iavro, J., Kuwahata, M., Taleo, G., & Clements, A. (2010). Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malaria Journal* .
- Cook, J., Speybroeck, N., Sochant, T., Somony, H., Sokny, M., Claes, F., y otros. (2012). Sero-epidemiological evaluation of changes in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax transmission patterns over the rainy season in Cambodia. *Malaria Journal* , 11(1):86.
- Corran P, C. P. (2007). Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trend in Parasitology* , 23 (12): 575-82.
- Corran, P., Cook, J., Lynch, C., Leendertse, H., Manjurano, A., & Griffin, J. (2008). Dried Blood spots as source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malaria Journal* .
- Cotter, C. H. (2013). "The Changing Epidemiology of Malaria Elimination: New Strategies for New Challenges." *the Lancet* , 382(9895): 900-911.
- Crompton, P. D. (2010). "A Prospective Analysis of the Ab Response to Plasmodium Falciparum before and after a Malaria Season by Protein Microarray." *Proceeding of the National Academy of Science* , 107 (15):6958-63.
- Discipline-specific Malaria Eradication Research Agenda. (2011). *The malERA Consultat in a Group on Monitoring, Evaluation and Surveillance*.
- Dodoo, D. A. (2008). "Cohort Study of the Association of Antibody Levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with Protection from Clinical Malaria in Ghanaian Children." *Malaria Journal* , 7 (1):142.
- Drakeley C, C. J. (2009). Chapter 5: Potential Contribution of Sero-Epidemiological Analysis for Monitoring Malaria Control and Elimination: Historical and Current Perspectives. *Elsevier* , 299-352.

- Drakeley, C., Corran, P., Coleman, P., Tongren, J., McDonald, S., Carneiro, I., y otros. (2005). Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *PNAS* .
- Druilhe, P. O. (1986). "Levels of Antibodies to Plasmodium Falciparum Sporozoite Surface Antigens Reflect Malaria Transmission Rates and Are Persistent in the Absence of Reinfection." *Infection and Immunity* , 53 (2):393-97.
- Eaton M. D., a. L. (1939). "COMPLEMENT FIXATION IN HUMAN MALARIA WITH AN ANTIGEN PREPARED FROM THE MONKEY PARASITE PLASMODIUM KNOWLESII." *The Journal of Experimental Medicine* , 69(3): 379-98.
- Eaton, M. D. (1939). "THE SOLUBLE MALARIA ANTIGEN IN THE SERUM OF MONKEYS INFECTED WITH PLASMODIUM KNOWLESII." *The Journal of Esperimental Medicine* , 69(4):517-32.
- Elliot SR, F. F. (2014). Research priorities for the development and implemetation of serological tools for malaria surveillance. *F1000 Prime Reports* .
- Enevold, A. W. (2007). "Potential Impact of Host Immunity on Malaria Treatment Outcome in Tanzanian Children Infected with Plasmodium Flaciparum." *Malaria Journal* , 6 (1):153.
- Feliciangeli, M. D.-L. (2003). "Chagas Disease Control in Venezuela: Lessons for the Andean Region and beyonf." *Trends in Parasitology* , 19 (1):44-49.
- Fernandez, I. R. (1992). "Serologic and Genetic Characterization of Plasmodium vivax From Whole Blood-Impregnated Filter Paper Discs." *The Americal Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 46 (4):473-79.
- Gagnon, A. S.-T. (2002). "The El Niño Southern Oscillation and Malaria Epidemics in South America. *International Journal of Biometeorology* , 46 (2): 81-89.
- Graves, P. M. (2009). "Individual, Household and Environmental Rosk Factors for Malaria Infection in Amhara, Oromia and SNNP Regions of Ethiopia." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 1103 (12): 1211-20.
- Gutierrez, S. C. (2003). "Manual de Procedimientos de Laboratorio para El Diagnostico de Malaria." *Ministerio de Salud*.
- Hafalla, J. C. (2011). "Cell Biology and Immunology of Malaria: Plasmodium/Host Interations." *Immunological Reviews* , 240 (1): 297-316.
- Hardelid, P. D.-B. (2008). "Analysis of Rubella Antibody Distribution from Newborn Dried Blood Spots Using Finite Mixture Models." *Epidemiology and Infection* , 136 (12):1698.
- Hay SI, G. C. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases* , 4(6):327-36.
- Igonet S, V.-L. N. (2007). Cross-reactivity studies of an anti-Plasmodium vivax apical membrane antigen 1 monoclonal antibody: binding and structural characterisation. *Journal of molecular biology* , 9;366(5):1523-37.
- Jackson, D. A. (1972). "Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and The Galactose Operon of Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* , 69 (10):2904-9.
- Jepsen, M. P. (2012). "Development and Evaluation of a Multiplex Screening Assay for Plasmodium Falciparum Exposure." *Journal of Immunological Methods* , 384 (1-2):62-70.
- Kagan, I. G. (1969). "Seroepideliogical Studies by Indirect Haemagglutination Test for Malaria. Military Recruit Colletions from Argentina, Brazil, Colombia, and The United States of America." *Bulletin of the World Health Organization* , 41 (6):825-11.
- Kielmann, A. G. (1970). "Further Investigations on Plasmodium Galiinaceun as an Antigen in the Diagnosis of Human Malaria." *Bulletin of the World Health Organization* , 43 (4): 617-22.

- Kinyanjui, S., Bull, P., Newbold, C., & Marsh, K. (2003). Kinetics of antibody responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocyte variant surface antigens. *Journal of Infectious Disease* , 667-674.
- Kobayashi, T., Chishimba, S., Shields, T., Hamapumbu, H., & Mharakurwa, S. (2012). Temporal and spatial patterns of serologic responses to Plasmodium falciparum antigens in a region of declining malaria transmission in southern Zambia. *Malaria Journal* .
- Kodrashin, A. A. (2014). "Mass Primaquine Treatment to Eliminate Vivax Malaria: Lessons from the Past." *Malaria Journal* , 13 (1):51.
- Lippincott, S. W. (1945). "COMPLEMENT FIXATION IN HUMAN MALARIA USING AN ANTIGEN PREPARED FROM THE CHICKEN PARASITE PLASMODIUM GALLINACEUM." *Journal of Clinical Investigation* , 24 (3):362-71.
- Ministerio de Salud Perú. (2014). *Malaria*. Sala de Situación de Salud.
- Morais CG, S. I. (2006). Antibodies to Plasmodium vivax apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 75(4):582-7.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2012). *Informe mundial sobre el paludismo 2012*.
- Organización Mundial de la salud. (07 de Mayo de 2014). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Temas de Salud: http://www.who.int/topics/risk_factors/es/
- Pathak, S., Rege, M., Gogtay, N., Aigal, U., Sharma, S., Valecha, N., y otros. (2012). Age-dependent sex bias in clinical malaria disease in hypoendemic regions. *PLoS One* .
- Perraut, R., Mercereau-Puijalon, O., Diouf, B., Tall, A., Guillotte, M., Le Scanf, C., y otros. (1990). Seasonal fluctuation of antibody levels to Plasmodium falciparum parasitized red blood cell-associated antigens in two senegalese villages with different transmission conditions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 746-751.
- Protopopoff, N., van Bortel, W., Speybroeck, N., van Geertruyden, J.-P., Baza, D., D'Alessandro, U., y otros. (2009). Ranking malaria risk factors to guide malaria control efforts in African highlands. *PLoS One* .
- Roestenberg M, R. E. (2008). Safety and Immunogenicity of a Recombinant Plasmodium falciparum AMA1 Malaria Vaccine Adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02. *PLoS ONE* , 3(12):e3960.
- Rosas-Aguirre A, L.-C. A.-M. (2013). Assessing malaria transmission in a low endemicity area of north-western Perú. *Malaria Journal* , 12(1):339.
- Rosas-Aguirre, A, G. D. (2016). Epidemiology of Plasmodium vivax Malaria in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 133-144.
- Sadanand, S. (2010). "Malaria: An Evaluation of the Current State of Research on Pathogenesis and Antimalarial Drugs". *The Yale Journal of Biology and Medicine* , 83 (4): 185-91.
- Siachoque H, G. F. (2006). Toxoplasma gondii: immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. *Exp. Parasitol* , 114(1):62-5.
- Sturrock, H. J. (2013). "Targeting Asymptomatic Malaria Infections: Active Surveillance in Control and Elimination." *PLoS Medicine* , 10 (6): e1001467.
- Twohig, K. A. (2019). "Growing Evidence of Plasmodium vivax across Malaria-Endemic Africa." Edited by Marcus VG Lacerda. *PLOS Neglected Tropical Diseases* , 13(1): e0007140.
- Vakali A, P. E. (2012). Malaria in Greece, 1975 to 2010. *Euro Surveill* , 17 (47).
- Voller, A. G. (1975). "New Serological Test for Malaria Antibodies." *British Medical Journal* , 1 (5959): 659-61.
- White, N. J. (2014). "Malaria". *The Lancet* , 383 (9918):723-35.
- Wilson, S., Booth, M., Jones, F., Mwatha, J., Kimani, G., Kariuki, C., y otros. (2007). Age-adjusted Plasmodium falciparum antibody levels in school-aged children are a stable marker of microgeographical variations in exposure to Plasmodium infection. *Infectious Diseases* .

Wong J, H. M. (2014). Serological markers for monitoring historical changes in malaria transmission intensity in a highly endemic region of Western Kenya, 1994-2009. *Malaria Journal*, 13 (1):451.

World Health Organization. (2013). *World Malaria Report 2013*. Francia: World Health Organization 2013.

9. ANEXOS

9.1 Encuesta epidemiológica

Código - -

Comunidad- N°Casa - Individuo

Fecha / /

Establecimiento de salud
al cual pertenece

A. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

1. Participante:

Apellido paterno

Apellido materno

Nombres

En caso de ser niño (menor de 14 años): identificación del padre, madre o tutor

2. Padre/tutor:

Apellido paterno

Apellido materno

Nombres

3. Domicilio actual:

4. Edad del entrevistado: ____ años

5. Sexo: ____ (1= Masculino; 2= Femenino)

6. ¿Cuántas personas viven en esta casa? ____

7. ¿Cuántos mosquiteros están usando en este momento? ____

8. Nivel de instrucción: ____

0= No sabe leer ni escribir; 1= Primaria iniciada; 2= Primaria terminada;
3= secundaria; 4= Superior

9. Religión: ____ (1= Católica; 2= Evangélica; 3=Otro: _____)

10. ¿Tiene usted un ingreso económico cada mes? ____ (0=No; 1= Si)

Si la respuesta es Sí, ¿cuánto es aproximadamente? _____ Nuevos Soles/mes

ACTIVIDADES ECONÓMICAS

LEA ESTA FRASE POR FAVOR!: A continuación le voy a hacer unas preguntas sobre las actividades o trabajos que ha hecho usted en el último año y en el último mes.

12. ¿Usted ha trabajado en su chacra el último mes? ____ (0=No; 1=Sí)

¿Cuántos días del mes ha trabajado en la chacra? ____ días

14. ¿Cuántas noches del último mes ha pasado fuera de casa para trabajar en la chacra? ____ noches.

15. ¿Usa mosquitero cuando pasa la noche en la chacra? ____

0= Nunca 1= A veces 2= Siempre 3=No duermo por la noche en la chacra

16. ¿Usted ha trabajado en la chacra el último año? ____ (0=No; 1=Sí)

17. ¿En qué época del año trabaja en la chacra? ____

1= época seca;

2=época de lluvias

3= Todo el año;

4. Otro: _____

18. ¿Ha trabajado como obrero durante el último año? ____ (0=No; 1=Sí)

- **Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 20**

- **Si la respuesta es Sí, continúe...**

19. ¿En qué época del año ha trabajado como obrero? ____

1= época seca;

2=época de lluvias

3= Todo el año;

4. Otros: _____

20. ¿Ha trabajado como obrero el último mes? ____ (0= No; 1= Sí)

- **Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 24**

- **Si la respuesta es Sí, continúe...**

21. ¿Cuántos días ha trabajado como obrero el último mes? ____ Días

22. ¿Cuántas noches del último mes ha trabajado como obrero? ____ Noches

23. ¿Usa mosquitero para dormir cuando trabaja como obrero? ____

0= Nunca 1= A veces 2= Siempre 3=No duermo por la noche en mi trabajo

24. ¿Usted ha trabajado como comerciante el último año? ____ (0=No; 1=Si)

- *Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 26*

- *Si la respuesta es Si, continúe...*

25. ¿En qué época del año realiza esta actividad? ____

1= época seca;

2=época de lluvias

3= Todo el año;

4. Otros: _____

26. ¿Usted se ha dedicado a esta actividad el último mes? ____ (0= No; 1= Si)

- *Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 30*

- *Si la respuesta es Sí, continúe...*

27. ¿Cuántos días en el último mes se ha dedicado a esta actividad? ____ días

28. ¿Cuántas noches ha dormido fuera de su casa para realizar esta actividad?
____ Noches

30. ¿Usted ha trabajado de motocarrista el último año? ____ (0=No; 1=Si)

- *Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 32*

- *Si la respuesta es Sí, continúe...*

31. ¿En qué época del año trabaja de motocarrista? ____

1= época seca;

2=época de lluvias

3= Todo el año;

4. Otros: _____

32. ¿Usted ha trabajado de motocarrista el último mes ____ (0= No; 1= Sí)

- *Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 35*

- *Si la respuesta es Sí, continúe...*

33. ¿Cuántos días ha trabajado de motocarrista en el último mes? ____ Días

34. ¿Cuántas noches ha pasado fuera de casa para trabajar de motocarrista el último mes? ____ Noches

35. ¿Ha hecho otros trabajos en el último mes? ____ (0=No; 1=Sí)

- *Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 65*

- *Si la respuesta es Sí, continúe...*

36. ¿Qué otros trabajos ha hecho el último mes?Especificar: _____

37. ¿Cuántos días se ha dedicado a este trabajo el último mes? ____ Días

38. ¿Cuántas noches ha dormido fuera de casa para hacer este trabajo en el último mes? ____ Noches

39. ¿Usa mosquitero cuando sale fuera de casa a realizar este trabajo? ____

0= Nunca 1= A veces 2= Siempre 3=No duermo por la noche fuera de casa por este trabajo

40. ¿Usted ha salido de viaje fuera de su comunidad durante el último mes? ____ (0=No; 1=Si)

- *Si la respuesta es No, pasar a la pregunta 43*

- *Si la respuesta es Sí, continúe...*

41. ¿A qué lugar? _____

42. ¿Cuánto tiempo permaneció en ese lugar? _____ (0=horas; 1=1 a 5 días; 2=6 a 10 días 3=11 a 15 días; 4=16 a 20 días; 5=21 a 25 días; 6=26 a 30 días).

43. ¿A qué hora usted acostumbra ir a dormir cuando duerme en su casa?

___ : ___

44. ¿Con qué frecuencia usa el mosquitero en su casa? _____

0= Nunca;

1=A veces;

2= Todos los días

C. ANTECEDENTE PERSONAL Y/O FAMILIAR DE MALARIA

45. ¿Cuándo fue la última vez que tuvo Malaria (confirmados por el Puesto de Salud)?

_____ / _____ (mes /año)

46. ¿Qué tipo de malaria tuvo la última vez? _____

1= Malariavivax o benigna;

2= Malariafalciparum o maligna

3= Malariamixta;

4. No recuerda

47. ¿Cuántas veces se enfermó usted de Malariavivax o benigna en el último año?

_____ veces (confirmados por el Puesto de Salud)

¿Cuántas de las personas que viven en esta casa se han enfermado de Malaria benigna en el último año? _____ personas (confirmado por el Puesto de salud)

D. ANTECEDENTES CLÍNICOS

49. ¿Usted ha tenido fiebre en las últimas 48 horas? ____ (0=No; 1=Si)

50. ¿Usted está tomando alguna medicación en este momento? ____ (0= No; 1= Si)

Si la respuesta es Si: especificar _____

51. Si está tomando alguna medicina para la malaria ¿Como se llama la medicación?

1= Cloroquina; 2= Cloroquina+Primaquina; 3=Mefloquina+Artesunato;

4=Otros:

especificar _____

E. DATOS CLÍNICOS ACTUALES Y DE LABORATORIO

52. Temperatura axilar: ____ . ____ °C

53. Palpación esplénica: ____

0=bazo no palpable; 1= bazo palpable solo a la inspiración profunda;

2= Esplenomegalia, _____ cm debajo del reborde costal izquierdo

54. Toma de Gota gruesa y frotis: ____ (0= No; 1= Si)

55. Toma de muestra en papel filtro: ____ (0= No; 1= Si)

56. Resultado de la microscopia: ____

0= Negativo; 1= Trofozoitos de *P. falciparum*; 2= Trofozoitos de *P. vivax*;

3= Malaria mixta; 4= gametocitos, especificar _____; 5= solo gametocitos, especificar _____

57. Si la microscopia es Positiva, determinar la densidad parasitaria:

- Densidad de parásitos asexuados (p/μl) _____ (si es mixta: _____ p/μl)

- Densidad de gametocitos (g/μl) _____ (si es mixta: _____ g/μl)

58. Síntomas del paciente: ____

0=asintomático 1=algún síntoma, especificar:

59. Tratamiento dado (indicar dosis): _____

Nombres y Apellidos del

Firma

Entrevistador

Fecha: ____ / ____ / ____

9.2 Interface de la plantilla utilizada para establecer el porcentaje de positividad

Tal como se mencionó en secciones previas (Descripción de la pantalla para el cálculo de los porcentajes de positividad), esta es la interface de la plantilla utilizada para procesar estas muestras. La plantilla en Excel comprende de 2 páginas.

Página 1: Se incluye información básica sobre las muestras y condiciones del ensayo (anticuerpo, antígeno, conjugado, pp, etc.)

ELISA - SAMPLE INFORMATION SHEET			
1.) date of execution :		05/02/2011	
2.) ELISA performed by:		Andrea Cuentas	
3.) Sample information list:			
<i>Note: per plate there are always 16 samples. So per ELISA always ONE list of 16 samples</i>			
SAMPLE PLATE ID	SAMPLE INFORMATION	PERCENT POSITIVITY 1	PERCENT POSITIVITY 2
1	A01-04	-1	-1
2	A01-05	-1	-1
3	A02-01	-2	-2
4	A02-02	-1	-1
5	A02-04	-1	-1
6	A02-06	-1	-1
7	A02-07	-1	-1
8	A03-02	-1	-1
9	A03-05	-1	-1
10	A04-01	-1	-1
11	A04-02	-1	-1
12	A04-04	-1	-1
13	A04-06	-4	-2
14	A05-02	-1	-1
15	A05-04	-1	-2
16	A06-03	-1	-1
4.) BATCH INFORMATION			
ANTIGEN	GLURP R2		
CONJUGATE	Anti-IgG peroxidasa		
STRONG POSITIVE	PA10, PA12		
WEAK POSITIVE	PA18, PS22		
NEGATIVE	PL, HR		

Página 2: Incluye el espacio para insertar los valores de OD. Además, se calcula la media de los controles, los valores corregidos de OD y los porcentajes de positividad.

1.) Information on ELISA Lay-out												
	Ag						non coated (negative control)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	++	-	1	5	9	13	++	-	1	5	9	13
B	++	-	1	5	9	13	++	-	1	5	9	13
C	++	-	2	6	10	14	++	-	2	6	10	14
D	++	-	2	6	10	14	++	-	2	6	10	14
E	+	BL	3	7	11	15	+	BL	3	7	11	15
F	+	BL	3	7	11	15	+	BL	3	7	11	15
G	+	BL	4	8	12	16	+	BL	4	8	12	16
H	+	BL	4	8	12	16	+	BL	4	8	12	16

2.) PASTE YOUR RAW DATA IN THE FRAME:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.339	0.098	0.1	0.1	0.102	0.101	0.114	0.106	0.118	0.115	0.112	0.164
B	2.043	0.09	0.086	0.092	0.087	0.1	0.099	0.099	0.102	0.112	0.099	0.125
C	1.113	0.091	0.08	0.089	0.088	0.091	0.103	0.101	0.099	0.108	0.102	0.107
D	1.075	0.09	0.077	0.087	0.084	0.091	0.1	0.1	0.096	0.102	0.103	0.111
E	0.476	0.08	0.086	0.089	0.093	0.104	0.101	0.094	0.114	0.105	0.103	0.117
F	0.477	0.084	0.093	0.087	0.086	0.09	0.106	0.092	0.126	0.109	0.102	0.113
G	0.283	0.078	0.073	0.084	0.08	0.08	0.082	0.084	0.089	0.096	0.096	0.094
H	0.309	0.076	0.081	0.081	0.084	0.082	0.086	0.078	0.095	0.093	0.101	0.1

3.) CALCULATION OF MEDIAN OF CONTROLS

3.1.) Corrected OD from strong positives:

C1	2.23
C2	1.94
C3	1.01
C4	0.98

Corrected OD from weak positives:

C1	0.38
C2	0.37
C3	0.20
C4	0.22

Corrected OD from negatives:

C1	-0.01
C2	-0.01
C3	-0.01
C4	-0.01

3.2.) MEDIAN of strong positives:

C _{median}	1.48
---------------------	------

MEDIAN of weak positives:

C _{median}	0.30
---------------------	------

MEDIAN of negatives:

C _{median}	-0.01
---------------------	-------

Note 1: this value is generated as follows:
 1. take the 4 corrected OD's from the strong positives
 2. discard the lowest and the highest value
 3. take the average from the 2 remaining values

Note 2: The median of the **STRONG POSITIVES** will serve as the 100% reference value for further analysis

4.) CALCULATION OF AVERAGE OF CORRECTED OD PER SAMPLE

SAMPLE ID	CORRECTED OD1	CORRECTED OD2	AVERAGE CORRECTED OD
1	-0.02	-0.02	-0.02
2	-0.02	-0.02	-0.02
3	-0.03	-0.03	-0.03
4	-0.02	-0.01	-0.02
5	-0.02	-0.02	-0.02
6	-0.02	-0.02	-0.02
7	-0.02	-0.02	-0.02
8	-0.01	-0.01	-0.01
9	-0.01	-0.01	-0.01
10	-0.01	-0.02	-0.02
11	-0.01	-0.02	-0.01
12	-0.02	-0.02	-0.02
13	-0.06	-0.03	-0.04
14	-0.02	-0.02	-0.02
15	-0.01	-0.02	-0.02
16	-0.01	-0.02	-0.02

5.) CALCULATION OF PERCENT POSITIVITY VALUES (PPs) FOR EACH SAMPLE

SAMPLE ID	PERCENT POSITIVITY 1	PERCENT POSITIVITY 2
1	-1	-1
2	-1	-1
3	-2	-2
4	-1	-1
5	-1	-1
6	-1	-1
7	-1	-1
8	-1	-1
9	-1	-1
10	-1	-1
11	-1	-1
12	-1	-1
13	-4	-2
14	-1	-1
15	-1	-2
16	-1	-1

Check for consistency between duplicates for each sample

max	min	Status
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-2	-2	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-1	-1	ok
-2	-2	ok
-1	-1	ok
-1	-2	ok
-1	-1	ok

CONTROL SHEET FOR NEGATIVE Ods

CHECK ON NEGATIVE OD

if the negative OD is over 0.35 the samples has to be rejected and retested

7	8	9	10	11	12
0.11	0.11	0.12	0.12	0.11	0.16
0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.13
0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11
0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11
0.10	0.09	0.11	0.11	0.10	0.12
0.11	0.09	0.13	0.11	0.10	0.11
0.08	0.08	0.09	0.10	0.10	0.09
0.09	0.08	0.10	0.09	0.10	0.10

9.3 Modelo mixto desarrollado por Ángel Rosas

Ángel Rosas, usando la metodología desarrollada por Corran y colaboradores (Corran, Cook, Lynch, Leendertse, Manjurano, & Griffin, 2008), modeló el modelo mixto de los pobladores de Bellavista. Los resultados del modelo y las 2 curvas gaussianas que determinó como personas expuestas y no expuestas se encuentran a continuación para PfAMA-1 y PvAMA-1:

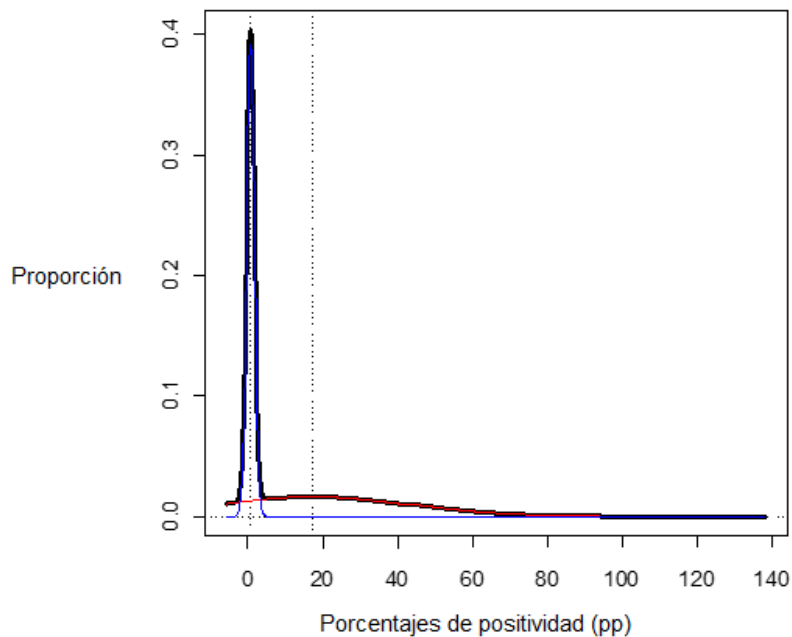


Gráfico 1: Distribución de los valores de pp contra PvAMA-1 en el modelo mixto.

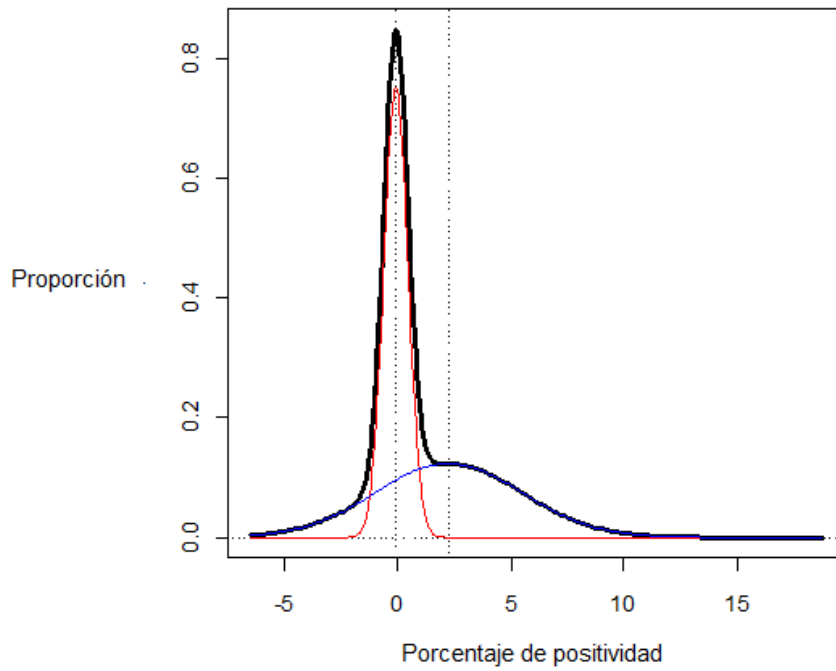


Gráfico 2: Distribución de los valores de pp contra PfAMA-1 en el modelo mixto.

La curva negra representa el modelo mixto mientras que las curvas azul y roja representan a la población expuesta y no expuesta. En el Gráfico 1, la curva roja representa a la subpoblación no expuesta mientras que la curva azul, a la población expuesta al antígeno. En el Gráfico 2, en cambio, la curva azul representa a la población no expuesta y la roja a la expuesta. A partir de cada curva, se halló la media y distribución estándar de cada población, contra cada antígeno PfAMA-1 y PvAMA-1.